



Facultad de Medicina
Departamento de Pediatría

Determinantes genéticos y dietéticos de los niveles de Proteína C reactiva y relación de estos niveles con alteraciones metabólicas en la infancia

-TESIS DOCTORAL-

M^a Pilar Navarro Sánchez
Licenciada en Biología

Directores:

Dra. Carmen Garcés Segura y Prof. Leandro Soriano Guillén

Laboratorio de Lípidos
IIS-Fundación Jiménez Díaz

La presente tesis doctoral ha sido realizada en el Laboratorio de Lípidos del IIS-Fundación Jiménez Díaz y dirigida por los doctores Carmen Garcés Segura y Leandro Soriano Guillén.

Los estudios de esta tesis doctoral han contado con la financiación de la Fundación Conchita Rábago y el Instituto de Salud Carlos III a través del proyecto FISPI14/00344.



La **Doctora Carmen Garcés Segura**, doctora en Ciencias Químicas y directora del laboratorio de Lípidos del IIS-Fundación Jiménez Díaz y el **Profesor Leandro Soriano Guillén**, Profesor Titular del Departamento de Pediatría de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe Asociado del Servicio de Pediatría de la Fundación Jiménez Díaz

INFORMAN:

Que **M^a Pilar Navarro Sánchez**, Licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid en la especialidad de Biosanitaria ha realizado bajo su dirección los trabajos de investigación correspondientes a la tesis doctoral: **“Determinantes genéticos y dietéticos de los niveles de Proteína C reactiva y relación de estos niveles con alteraciones metabólicas en la infancia”**.

Revisado el presente trabajo, estiman que se corresponde fielmente a los resultados obtenidos y quedan conforme con su presentación para ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman la presente en Madrid, a veintiuno de febrero del dos mil diecisiete.

Dra. Carmen Garcés Segura

Prof. Leandro Soriano Guillén

A mis padres y a mi hermana

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer la realización de esta tesis a mis directores Carmen Garcés y Leandro Soriano. A Carmen por su gran apoyo e implicación durante estos años de doctorado, por su cariño y comprensión en todo momento y sus constantes consejos que me han servido para aprender y valorar mi trabajo. A Leandro igualmente por acogerme con los brazos abiertos, y por su constante ayuda y afecto en todos estos años.

A Manuel de Oya en homenaje a su memoria, ya que gracias a él y al estudio cuatro provincias, del cual me siento muy orgullosa de participar, forma parte esta tesis que espero sea aliciente en el desarrollo de más trabajos de investigación futuros del laboratorio de lípidos.

A la Fundación Conchita Rábago por la concesión de una beca predoctoral gracias a la cual he podido realizar mi trabajo estos años y a Marta especialmente por su cariño y afecto.

A mis compañeras del laboratorio de lípidos; en primer lugar, a Lorena por abrirme las puertas y explicarme todo en mis inicios, a tu amistad única e incondicional de tantos años, que me ha ayudado y animado con su optimismo y alegría en los momentos buenos como en los malos. A Teresa por apoyarme tanto y darme tan buenos consejos desde el punto de vista pediátrico. A Olaya por su gran simpatía y cariño, que siempre tiene una sonrisa y palabras de ánimo, espero que todo te vaya muy bien ya que eres la próxima en este camino de doctorado. A Elisa que es la última incorporación del laboratorio, espero que saques un TFG estupendo y sigas siendo tan buena compañera y tan maja.

A las chicas de neuro Gentzane, Gema, Laura, Rosa y Marina que han estado ahí para echar una mano siempre que lo necesitabas y han tenido en todo momento una palabra de afecto y cariño. Gracias por los buenos momentos compartidos.

A mis amigas del pueblo, Sara, Gloria, Luisa, Úrsula, Eva, Marife, las Alicias... que me habeis animado tanto durante estos años en especial a Sara y Alicia M. que saben lo que supone trabajar en investigación y por tantos consejos. Espero teneros a todas siempre a mi lado.

A mis tíos y primos porque siempre me habeis demostrado vuestro interés y apoyado constantemente, por ser parte de mi familia y compartir tan buenos momentos en familia.

Y por último a mis padres y hermana, mis grandes pilares en la vida, los que me dan fuerza y sostén para que siga luchando por mis sueños, por escucharme diariamente en todo este proceso de aprendizaje, y por su amor y protección en todo cuanto hago.

RESUMEN

La obesidad induce un estado inflamatorio crónico de bajo grado ya desde la infancia, que favorece la aparición posterior de resistencia a la insulina e incrementa el riesgo de aterogénesis, entre otras comorbilidades. Este estado de inflamación subclínica puede valorarse mediante la cuantificación de diversos biomarcadores tales como la proteína C reactiva (PCR), el factor de necrosis tumoral alpha y las interleucinas. Así pues, estos biomarcadores se encuentran elevados en sujetos obesos.

En nuestro estudio hemos determinado los niveles de PCR de alta sensibilidad (PCRas) en población infantil, concretamente en dos cohortes, niños de edad prepuberal (6-8 años) y adolescentes (12-16 años), y hemos estudiado su asociación con variaciones en el grado de obesidad, así como con los niveles plasmáticos de lípidos y otras adipoquinas como la leptina. Por otra parte, hemos analizado posibles determinantes genéticos de los niveles de PCRas y evaluado el papel de la dieta como modulador de los valores sanguíneos de PCRas.

Nuestros resultados muestran que el paso de un estado de exceso de peso en la edad prepuberal a normopeso en la adolescencia, se asocia con una mejoría considerable en los valores de PCRas frente a los niveles más elevados observados en los niños que permanecen obesos a ambas edades. Por otra parte, niveles bajos de PCR se asocian con los niveles más altos de c-HDL y Apo-A1 en los dos grupos de edad de nuestro estudio. Otro resultado es la asociación significativa de los niveles de PCRas con los niveles de leptina, independiente del IMC. Respecto a los factores genéticos relacionados con niveles de PCRas, en nuestra población se observa una asociación de polimorfismos de distintas regiones del gen PCR (rs1205, rs1130864, rs2794521 y rs1800947) y de sus haplotipos con niveles plasmáticos de PCRas. Además, hemos encontrado una interesante asociación de los niveles de PCRas con SNPs de los genes de leptina y receptor de la leptina, apoyando la idea de que otros loci pueden influir en estos niveles. Por último, nuestros datos destacan la influencia de la dieta sobre los niveles de PCRas, ya que una dieta rica en frutas y verduras, con alto contenido en fibra, está asociada a valores más bajos de PCRas.

En conclusión, nuestros datos apoyan la reversibilidad del estado de inflamación crónica asociado a la obesidad infantil tras la normalización ponderal. Asimismo, los datos obtenidos en nuestro estudio apuntan a la participación de la leptina en el estado de inflamación crónica observado en la obesidad. Finalmente, nuestros datos han permitido concluir que una dieta saludable parece influir de forma positiva en la atenuación del riesgo cardiovascular, de modo que medidas preventivas adecuadas durante la infancia pueden contribuir a mejorar el estado inflamatorio de bajo grado observado en los niños.

ABREVIATURAS

Abs250: Absorbancia a 250nm

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADSF: Factor secretado por el tejido adiposo

AGL: Ácidos grasos libres

ANOVA: Análisis de la varianza

Apo: Apolipoproteína

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

AT1-R: Receptor de la angiotensina 1

AVENA: Alimentación y Valoración del Estado Nutricional en Adolescentes

C-LDL: Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (*Cholesterol-low density lipoprotein*)

C-HDL: Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (*Cholesterol-high density lipoprotein*)

CH: Carbohidratos

CG: Carga glucémica

CT: Colesterol total

DHEA-S: Dehidroepiandrosterona-sulfato

DMT2: Diabetes *mellitus* tipo 2

ECV: Enfermedad cardiovascular

ELISA: Enzimoinmunoensayo

FIZZ3: Región de zona inflamatoria (*found in inflammatory zones*)

HEI: *Health Eating Index*

HOMA-IR: *homeostasis model of assessment-insulin resistance*

HGF: factor de crecimiento del hepatocito

IAS: Índice de Alimentación Saludable

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

eNOS: óxido nítrico sintetasa endotelial

IDEFICS: *Identification and prevention of Dietary- and lifestyle-induced health Effects In Children and infantS.*

IG: Índice glucémico

IL: Interleuquina

IMC: Índice de masa corporal

IOTF: *International Obesity Task Force*

IRMA: Ensayo inmunorradiométrico

LEP: Gen de la leptina

LEPR: Gen del receptor de la leptina

LIF: Factor inhibidor de leucemia

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1

MIMF: Factor inhibitorio de la migración de macrófagos

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

MUFAs: Ácidos grasos monoinsaturados (*monounsaturated fatty acids*)

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NHANES: *National Health and Nutrition Examination Survey*

OMS: Organización Mundial de la Salud

4P: Cuatro Provincias

PAD: Presión arterial diastólica

PAS: Presión arterial sistólica

PAI-1: Inhibidor del activador de plasminogeno

PCR: Proteína C reactiva

PCRas: Proteína C reactiva de alta sensibilidad

PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados (*polyunsaturated fatty acids*)

RBP4: *Retinol binding protein-4*

RIA: Radioinmunoensayo

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

SAA: Proteína sérica amiloide A

SEEDO: Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad

SFAs: Ácidos grasos saturados

SHBG: globulina transportadora de hormonas sexuales

SNPs: Polimorfismos de un sólo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphisms*)

SoFAAS: Grasas sólidas y azúcares añadidos (*Solid Fats and Added Sugars*)

TG: Triglicéridos

TLR's: Receptores de ligando tipo Toll

TNF- α : Factor de necrosis tumoral tipo α

UCP1: Proteína desacoplante 1

3'UTR: Región 3' no traducible de un gen

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad (*very low-density lipoprotein*)

WHO: *World Health Organization*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN LA INFANCIA	3
1.1. La obesidad como factor de riesgo cardiovascular en la infancia	4
1.2. Clasificación de sobrepeso y obesidad en niños	5
1.3. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en la infancia	7
2. OBESIDAD COMO ESTADO INFLAMATORIO CRÓNICO DE BAJO GRADO	8
2.1. Características del tejido adiposo	8
2.2. Sustancias sintetizadas por el tejido adiposo	10
2.3. Obesidad, respuesta inmunitaria e inflamación	11
3. PROTEÍNA C REACTIVA	17
3.1. Características de la Proteína C reactiva	17
3.2. Proteína C reactiva y Proteína C reactiva de alta sensibilidad	18
3.3. Proteína C reactiva y su asociación con obesidad infantil	21
4. GEN DE LA PCR Y SUS VARIANTES POLIMÓRFICAS	23
4.1. Polimorfismos del gen de PCR y asociación con niveles de PCRas	23
4.2. Otras variantes polimórficas asociadas con niveles de PCR	25
4.3. Polimorfismos de PCR y enfermedad cardiovascular	26
5. FACTORES DIETÉTICOS E INFLAMACIÓN CRÓNICA DE BAJO GRADO	28
5.1. Dieta y respuesta inmune	28
5.2. Principios inmediatos implicados en inflamación de bajo grado	29
5.3. Alimentos implicados en inflamación de bajo grado	35
5.4. Índice de Alimentación Saludable e inflamación de bajo grado	37
5.5. Patrones dietéticos y su relación con PCR	39
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	42
MATERIALES Y MÉTODOS	47
1. SELECCIÓN DE LA MUESTRA	49
1.1. Población	49
1.2. Procedimiento de muestreo	49
2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA	50
3. DETERMINACIONES ANTROPOMÉTRICAS	51
3.1. Obtención del peso, talla e IMC	51
3.2. Índices antropométricos	52
4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS EN EL ESTUDIO 4P	53
4.1. Determinaciones lipídicas	53

4.2. Determinaciones de insulina e índice HOMA-IR.....	54
4.3. Determinación de los niveles de adipoquinas	55
5. DETERMINACION DE NIVELES DE PROTEINA C REACTIVA.....	56
6. DETERMINACIONES GENÉTICAS.....	58
6.1. Obtención y cuantificación del ADN.....	58
6.2. Determinaciones de los polimorfismos en los genes <i>PCR</i> , <i>LEP</i> y <i>LEPR</i>	59
7. INFORMACIÓN ALIMENTARIA Y NUTRICIONAL	63
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	65
9. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	66
RESULTADOS	69
1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN	71
1.1. Características antropométricas de la población	71
2. NIVELES DE PCRas EN LA POBLACIÓN	74
3. NIVELES DE PCRas Y VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS	75
3.1. Niveles de PCRas por categoría de obesidad.....	75
3.2. Relación de los niveles de PCRas con las variables e índices antropométricos y con la composición corporal.....	76
3.3. Niveles de PCRas y cambios de categoría de obesidad.....	77
4. NIVELES DE PCRas CON VARIABLES BIOQUÍMICAS.....	79
4.1. Asociación de los niveles de PCRas con el perfil lipídico.....	79
4.2. Asociación de los niveles de PCRas con las variables relacionadas con la resistencia a la insulina.....	81
4.3. Relación de los niveles de PCRas con adipoquinas.....	82
5. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNPs) EN EL GEN DE PCR.....	85
5.1. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs de PCR.....	85
5.2. Relación de los SNPs de PCR con los niveles de PCRas.....	87
5.3. Relación de los SNPs de PCR con las variables antropométricas	90
5.4. Relación de los SNPs de PCR con el perfil lipídico	94
5.5. Relación de los SNPs de PCR con las variables relacionadas con la resistencia a la insulina	96
5.6. Relación de SNPs de LEP y LEPR con los niveles de PCR.....	98
5.7. Relación de los SNPs de PCR con los niveles de leptina.....	99
6. RELACION DE LOS NIVELES DE PCR CON LA INGESTA DIETÉTICA.....	100
6.1. Características de la dieta en niños y niñas de la población de estudio	100
6.2. Ingesta diaria de nutrientes según terciles de PCR en niños y niñas.....	102
6.3. Consumo de alimentos según terciles de PCR en niños y niñas	105
6.4. Patrones dietéticos y su influencia sobre PCR en niños y niñas.....	105

DISCUSIÓN	108
<i>Relación de los niveles de PCRas con IMC y obesidad en niños</i>	<i>111</i>
<i>Relación de los niveles de PCRas con variables lipídicas.....</i>	<i>113</i>
<i>Relación de los niveles de PCRas con resistencia a la insulina</i>	<i>114</i>
<i>Relación de los niveles de PCRas con niveles de leptina</i>	<i>115</i>
<i>Asociación de polimorfismos del gen PCR con niveles de PCRas.....</i>	<i>116</i>
<i>Asociación de polimorfismos del gen LEP y LEPR con niveles de PCRas</i>	<i>117</i>
<i>Asociación de polimorfismos del gen PCR con variables antropométricas, resistencia a insulina y perfil lipídico.....</i>	<i>119</i>
<i>Relación de la ingesta de alimentos, nutrientes y IAS con niveles de PCRas en niños prepuberales</i>	<i>120</i>
<i>Patrones dietéticos y niveles de PCRas en niños prepuberales</i>	<i>123</i>
CONCLUSIONES	126
BIBLIOGRAFÍA.....	130
ANEXOS.....	156
Publicaciones	158

INTRODUCCIÓN

1. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN LA INFANCIA

La arterioesclerosis es un proceso que se desarrolla en las primeras décadas de la vida, evolucionando de forma asintomática hasta la edad adulta. La detección de lesiones ateroscleróticas en las arterias coronarias de individuos menores de 20 años (Tuzcu *et al* 2001) evidencian el comienzo de la enfermedad a edades tempranas.

Ya en la década de los 70, Barker y su grupo sugirieron la hipótesis de la "programación" de la cardiopatía isquémica. Según esta teoría la enfermedad en el adulto sería consecuencia de adaptaciones metabólicas a diversos factores medioambientales tales como la escasez de nutrientes ya en la vida intrauterina (Barker 1995) y en la infancia temprana (Barker 1994).

En una línea similar, surgieron estudios como *The Bogalusa Heart Study* que relacionaban la presencia de factores de riesgo cardiovascular en los primeros años de vida con el riesgo de enfermedad coronaria en el adulto (Berenson *et al* 1989, Berenson *et al* 1992). Este estudio demostró, por ejemplo, una asociación de factores de riesgo tales como el índice ponderal (IP) (kg/m^3), la presión sistólica o los niveles plasmáticos de colesterol, con un aumento del riesgo cardiovascular (Berenson *et al* 1989). Otro estudio realizado en Inglaterra en el que se analizaban factores de riesgo cardiovascular en niños de 5 a 7 años de 10 ciudades inglesas, 5 con alta mortalidad por enfermedad cardiovascular y 5 con baja mortalidad cardiovascular, también se observó que los niños procedentes de las ciudades con alta tasa de mortalidad cardiovascular tenían mayor peso, índice ponderal ($\text{peso}/\text{talla}^3$) y presión arterial que los niños procedentes de las ciudades con baja tasa de mortalidad cardiovascular (Whincup *et al* 1996).

En este contexto, en el año 1997 nuestro grupo puso en marcha en nuestro país el estudio Cuatro Provincias (4P), en el que se comparan factores de riesgo cardiovascular en población infantil de cuatro provincias españolas con distintas

tasas de mortalidad cardiovascular en el adulto: Cádiz y Murcia, de alta mortalidad, y Madrid y Orense, de baja mortalidad (Rodríguez Artalejo *et al* 1999). Uno de los resultados más interesantes del "Estudio 4P" es la gran diferencia en la prevalencia de obesidad observada entre las provincias estudiadas, siendo casi el doble en las provincias de alta mortalidad (15,9% en Cádiz y 14,1% en Murcia) que en las de baja mortalidad (8% en Madrid y 9,4% en Orense) (Rodríguez-Artalejo *et al* 2002), de modo que nuestros datos apoyan la relación entre la obesidad en la infancia y el riesgo cardiovascular futuro (Garcés y de Oya 2007).

Otros estudios han confirmado esta asociación entre el riesgo de enfermedad cardiovascular y la presencia de obesidad (Berenson *et al* 1993) o un IMC elevado en la infancia (Baker *et al* 2007).

Dado que la obesidad se asocia con la aparición de factores de riesgo cardiovascular ya a edades tempranas (Berenson *et al* 1993, Short *et al* 2009, Herouvi *et al* 2013), un mayor riesgo cardiovascular en la edad adulta, se ha asociado, igualmente, con los factores de riesgo cardiovascular relacionados con ella presentes en la infancia, factores de riesgo tales como la intolerancia a la glucosa (Chu *et al* 1998, Rizk y Yousef 2012), la hiperinsulinemia (Shea *et al* 2003), la resistencia a la insulina (Sinha *et al* 2002), la diabetes tipo 2 (Dietz 2001, Rocchini 2002), la dislipemia (Friedland *et al* 2002) y la hipertensión arterial (Williams *et al* 1992, Sorof *et al* 2004).

1.1. La obesidad como factor de riesgo cardiovascular en la infancia

La obesidad consiste en el incremento del peso corporal, fundamentalmente a expensas del aumento del tejido adiposo, originado como resultado de un desequilibrio entre ingesta y gasto energético (OMS 2004). Se trata de una enfermedad crónica de etiología multifactorial en la que están implicados tanto

factores genéticos como ambientales (Smyth y Heron 2005, Oda *et al* 2008). Es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una auténtica epidemia mundial y uno de los problemas de salud pública más visible, siendo la segunda causa de mortalidad prematura y evitable, después del tabaco.

La obesidad, como se ha comentado previamente, está relacionada con otros factores de riesgo cardiovascular como dislipemia, hipertensión y resistencia a insulina. En definitiva, se encuentra entre los factores de riesgo más consistentemente asociados a la aparición del proceso aterosclerótico (Abate 2000, McGill *et al* 2002).

De hecho, existen evidencias notables de que la obesidad tiende a persistir en la vida adulta ocasionando un incremento de la morbilidad y la mortalidad (Power *et al* 1997, Wabitsch 2000).

1.2. Clasificación de sobrepeso y obesidad en niños

Al igual que en el adulto, en la infancia y adolescencia el parámetro más extendido en la cuantificación de la obesidad es el índice de masa corporal (IMC= kg/m^2), variable ya descrita en el año 1869 por el astrónomo belga Adolphe Quetelet. Este parámetro tiene una buena correlación con la composición de grasa corporal. Sin embargo, en niños existe controversia en cuanto a los puntos de corte de IMC para definir el exceso de peso, ya sea en forma de sobrepeso o en forma de obesidad (Tabla 1).

Existen estudios poblacionales, en niños, que definen estándares internacionales, entre los que destacaríamos el elaborado por Cole y colaboradores en el año 2000 (Cole *et al* 2000) que reúne los datos de IMC provenientes de población infanto-juvenil de seis países y que actualmente es el recomendado por la *International Obesity Task Force* (IOTF) (Chinn & Rona 2002). Este grupo establece nuevos puntos de cortes en 2012 que no presentan

diferencias importantes respecto a los publicados anteriormente y no afectan a las estimaciones de prevalencia de sobrepeso u obesidad (Cole y Lobstein 2012).

Otras clasificaciones, como en el año 2000, el *Center for Disease Control* incorpora datos de sobrepeso y obesidad de Estados Unidos, estableciendo puntos de corte de IMC en niños y adolescentes (CDC 2000).

En España, en el año 2006 el Ministerio de Sanidad publicó una guía práctica para la prevención y el tratamiento de la obesidad infanto-juvenil en la que se establecían puntos de corte de sobrepeso y obesidad teniendo en cuenta las tablas de Hernández (Hernández *et al* 1988).

Tabla 1. Criterios de sobrepeso y obesidad atendiendo a diferentes referencias poblacionales a edad infantil.

	Sobrepeso	Obesidad	Referencia poblacional
<i>"International Obesity Task Force"</i>	IMC= p91 a p98	IMC \geq p99	Cole <i>et al</i> 2000
	IMC= p90 a p98	IMC \geq p98	Cole y Lobstein 2012
<i>"Center for Disease Control, USA"</i>	IMC= p85 a p94	IMC \geq p95	CDC 2000
<i>"Guía práctica para la prevención y el tratamiento de la obesidad infanto-juvenil del Sistema Nacional de Salud"</i>	IMC=p90 a p97	IMC \geq p97	Hernández <i>et al</i> 1988

Otros parámetros antropométricos a tener en cuenta en la valoración del estado nutricional son:

La circunferencia de la cintura: se trata de la medida del perímetro abdominal, y se utiliza para valorar el exceso de grasa abdominal, considerado

como un factor notable de riesgo cardiovascular. Por tanto, es un indicador que evalúa el riesgo de las comorbilidades más frecuentes asociadas a la obesidad, caracterizadas por un exceso de grasa abdominal. En la edad pediátrica existen tablas que permiten percentilar el índice de cintura, considerando un valor de riesgo cardiovascular el que se sitúa por encima del percentil 90 para la edad y sexo (Fernández *et al* 2004).

El cociente índice cintura/cadera: es otro parámetro útil donde se acepta que los valores superiores al percentil 90 de este cociente en la población estudiada representan un importante riesgo cardiometabólico.

1.3. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en la infancia

En España se han realizado diversos estudios cuyo propósito era analizar la prevalencia de obesidad infantil como el estudio PAIDOS en 1984 donde se documentó un 4,9% de obesidad en niños de 6 a 13 años (PAIDOS' 84).

En adolescentes españoles (13-18 años) el estudio AVENA (Alimentación y Valoración del Estado Nutricional en Adolescentes), desarrollado entre 2000 y 2002, demostró una prevalencia de sobrepeso y obesidad del 25,69% y 19,13% entre varones y mujeres, respectivamente (González-Gross *et al* 2003).

En el año 2000, en el estudio ENKID se observó un 13,9% de obesidad en población infanto-juvenil (2 a 24 años), y una prevalencia de sobrepeso del 12,4% (Serra Majem *et al* 2001).

Del estudio 4P también se derivaron resultados de prevalencia de sobrepeso y obesidad en población española teniendo en cuenta los puntos de corte propuestos por Cole y colaboradores (Cole *et al* 2000). Así, el estudio de niños prepuberales de 6 a 8 años realizado a lo largo del año 1999 mostró una prevalencia de obesidad y sobrepeso del 9,4% y 15,7%, respectivamente, en niños y del 10,5% y 18,0%, respectivamente, entre las niñas (Garcés *et al* 2005). Con

posterioridad, se publicaron datos de prevalencia de sobrepeso correspondientes a un estudio en adolescentes realizado durante el año 2005 (del Villar-Rubín *et al* 2013) en el que el 29,2% de niños y el 21,4% de niñas tenían sobrepeso.

El estudio ALADINO 2011 es otro estudio español donde se evaluó la prevalencia de sobrepeso y obesidad en 7.659 niños de 6 a 9 años. En este estudio se encontró un 44,5% de niños con exceso de peso (26,2% sobrepeso y 18,3% obesidad) según criterios del Ministerio de Sanidad utilizando las tablas de Hernández de 1988 (Pérez-Farinos *et al* 2013). Estos datos fueron actualizados en el 2013 en el estudio ALADINO 2013, que incluía 3.426 niños (1.682 niños y 1.744 niñas) de 7 y 8 años. La prevalencia de sobrepeso hallada fue del 24,6 % (24,2 % en niños y 24,9 % en niñas), y la prevalencia de obesidad fue del 18,4 % (21,4 % en niños y 15,5 % en niñas), utilizando los mismos criterios de selección que el trabajo de campo del 2011. De esta forma, se pudo constatar que la cifra global de exceso de peso en 2011 era de 44,5% frente a un 43% en el estudio posterior del 2013, lo que sugiere cierta estabilización en la prevalencia de esta patología entre los niños españoles (Ortega y López-Solaber 2014).

2. OBESIDAD COMO ESTADO INFLAMATORIO CRÓNICO DE BAJO GRADO

2.1. Características del tejido adiposo

El tejido adiposo no es solo un órgano dedicado a la reserva energética, sino que se considera una auténtica glándula endocrina puesto que produce y secreta un número importante de mediadores biológicamente activos que modulan múltiples procesos en el organismo tales como el balance energético, la sensibilidad a la insulina, la respuesta inmune, la angiogénesis y el metabolismo hidrocarbonado y lipídico, entre otros (Frühbeck *et al* 2001, Galic *et al* 2010, Cao 2014).

El tejido adiposo está formado por la matriz estromovascular y los adipocitos. En esta matriz se encuentran diferentes células como los preadipocitos, monocitos y macrófagos (Wisse 2004).

Según su función y morfología, el tejido adiposo se puede clasificar en tejido adiposo blanco y marrón o pardo. El tejido adiposo blanco (unilocular) es el responsable de almacenar energía, tiene bajo contenido mitocondrial, poco citoplasma y no contienen la proteína desacoplante 1 (UCP1). Además, se conoce desde hace tiempo que las células adiposas blancas pueden tener cierta actividad proinflamatoria durante el proceso de instauración de la obesidad (Hotamisligil *et al* 1993). Por otra parte, el tejido adiposo marrón (multilocular) cumple la función de disipar energía en forma de calor, protegiendo contra la hipotermia en la mayoría de los mamíferos, debido a que dispone de un contenido relativamente elevado de mitocondrias que contienen UCP1. Esta proteína causa una pérdida de protones a través de la membrana interna de la mitocondria, liberando así energía química en forma de calor. Este hecho, determina un importante papel en la prevención de la aparición de obesidad (Cypess *et al* 2009).

Otro tejido adiposo interesante y poco estudiado es el "*beige*", que parece tener funciones intermedias entre el blanco y el marrón. Estas células adiposas también llamadas "*brite*", contienen una mayor carga mitocondrial que las blancas y comienzan a expresar UCP1 (Ishibashi *et al* 2010).

Según la localización del tejido adiposo podemos clasificarlo en visceral o subcutáneo (Boscaro *et al* 2012). Aunque constituye una línea de investigación en auge y, por tanto, queda mucho camino por recorrer, parece que el papel funcional del tejido adiposo visceral y subcutáneo es diferente merced a los descubrimientos relacionados con la secreción predominante de distintas adipoquinas (Tfayli y Arslanian 2008, Fontana *et al* 2007, Hajer *et al* 2008).

2.2. Sustancias sintetizadas por el tejido adiposo

Desde el descubrimiento inicial en 1994 de la secreción por parte del tejido adiposo de leptina (Zhang *et al* 1994), son numerosas las moléculas que se han ido descubriendo con posterioridad. Estas sustancias sintetizadas por el tejido adiposo se denominan adipocitoquinas (tabla 2) y se han relacionado fundamentalmente con el metabolismo energético y la inflamación, aumentando o disminuyendo en condiciones de obesidad (Hajer *et al* 2008, Booth *et al* 2016).

En la tabla 2 se muestran las principales adipoquinas secretadas por el tejido adiposo por el cual se le considera un auténtico órgano endocrino.

Tabla 2. Adipocitoquinas secretadas por el tejido adiposo y principales funciones (adaptado de Lee *et al* 2013).

ADIPOCITOQUINAS	FUNCIONES	OBESIDAD
Hormonas regulación energética		
Leptina	Regulación de la saciedad y gasto energético basal y reproducción (Ceddia 2002)	↑
Adiponectina	Regulación del metabolismo lipídico, sensibilidad a insulina (Ekmekci 2006)	↓
Visfatina	Efectos insulino-miméticos (Fukuhara 2005)	↑
Resistina	Resistencia a la insulina, regulación inflamación (Steppan 2001)	↑
Adipsina	Mejora el almacenamiento de grasas a través del transporte de glucosa (Lo 2014)	↑
Citoquinas		
Factor de necrosis tumoral (TNF- α)	Pro-inflamatorias, antagonismo de la señalización de la insulina (Koh 2005)	↑
Interleuquina 1 (IL-1)	Pro-inflamatoria, mediador temprano de inflamación (Mandrup-Poulsen 1996)	↑
Interleuquina 4 (IL-4)	Anti-inflamatoria, inhibición de citoquinas proinflamatorias (Brown 1997)	↓
Interleuquina 6 (IL-6)	Pro-inflamatoria, regulación de la homeostasis energética y la inflamación (Horn 2000)	↑
Quimioquinas		
Proteína quimioatrayente de macrófagos (MCP-1)	Regulación de la inflamación, atracción de macrófagos (Xu 2015)	↑
Reactantes de fase aguda		
Inhibidor del activador de plasminogeno (PAI-1)	Inhibición endotelial del activador del plasminógeno, fibrinólisis (Barnard 2016)	↑
Proteína sérica amiloide A (SAA)	Reclutamiento células inmunes. Transporte de colesterol (Voudris 2015)	↑
Proteína C reactiva (PCR)	Mejora la fagocitosis de los macrófagos. Respuesta inmune innata (Voudris 2015)	↑
Otros factores		
Proteína transportadora de retinol 4 (RBP4)	Metabolismo lipídico y resistencia a insulina (Christou 2012)	↑
Factor de crecimiento endotelial (VEGF)	Estimula la vasculogénesis, angiogénesis y citoquinas por células T (Ren 2016)	↑

↑: aumenta ↓: disminuye

2.3. Obesidad, respuesta inmunitaria e inflamación de bajo grado

Con la aparición de la obesidad se presentan alteraciones en la respuesta inmunitaria ya que se genera un proceso inflamatorio que suele ser crónico y de

bajo grado de intensidad. Este proceso también está presente en otras enfermedades asociadas, tales como diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), hipertensión, dislipemias y enfermedades cardíacas (Berg y Scherer 2005, Lau *et al* 2005, Fantuzzi 2005).

Con la aparición y mantenimiento de la obesidad se presenta un fenómeno de inflamación de bajo grado en el que participan una red de células del sistema inmune innato, el más antiguo y conservado filogenéticamente (Kimbrell y Beutler 2001). Este sistema cuenta con un grupo especializado de células, los macrófagos, cuya función es reconocer ligandos endógenos y exógenos (agentes patógenos). Este reconocimiento se lleva a cabo a través de receptores codificados en la línea germinal, como los Toll (TLR's) (Jialal *et al* 2014). Estos receptores activan rutas de señalización comunes que culminan con la translocación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B), proteína clave en la cascada inflamatoria (Barton y Medzhitov 2003). A continuación, se produce un incremento de la secreción de citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral tipo alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), e interleucina-1 beta (IL1- β).

Aunque los TLR's se expresan en su mayoría en células del linaje hematopoyético, un amplio número de estudios describe su expresión en otros tipos celulares, como el tejido adiposo, y en particular, en los adipocitos (Vitseva *et al* 2008, Poulain-Godefroy *et al* 2010).

Por otra parte, los adipocitos estimulados por señales de origen infeccioso o inflamatorio secretan mediadores de inflamación. Entre estas moléculas relacionadas con la inflamación se incluyen TNF- α , IL-6, inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), IL-1 β , IL-8, 10, 15, factor inhibidor de leucemia (LIF), factor de crecimiento del hepatocito (HGF), apolipoproteína A3 (SAA3), factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIMF). Además, el tejido adiposo es fuente de síntesis de adipoquinas que se han relacionado con la inflamación, como leptina,

adiponectina y resistina (Lau *et al* 2005, Rajala y Scherer 2003, Yamagishi *et al* 2005).

En la génesis de la obesidad se objetivan cambios en el tejido adiposo: a) hipertrofia: aumento del tamaño del adipocito; b) hiperplasia: incremento en el número de los adipocitos (Spalding *et al* 2008). De esta manera, el crecimiento y expansión de este tejido apreciado en las situaciones de obesidad produce un estado de hipoxia, lo que genera una liberación de factores inflamatorios, así como un incremento de la secreción de algunas adipoquinas, ya mencionadas anteriormente, que incrementan la vascularización del tejido adiposo (angiogénesis) y potencian la liberación de sustancias pro-aterogénicas y pro-inflamatorias (Lolmède *et al* 2003, Trayhurn y Wood 2004, Hajer *et al* 2008).

En estudios experimentales en ratones obesos, se ha observado que las variaciones en la expresión génica de IL-6 y TNF- α en el tejido adiposo blanco están relacionadas con la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo (Weisberg *et al* 2003, Xu *et al* 2003). Estos macrófagos son responsables de la mayor parte de la producción de IL-6, TNF- α y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Weisberg *et al* 2003). Además, esta infiltración de macrófagos también ha sido documentada en tejido adiposo proveniente de pacientes obesos (Cinti *et al* 2005, Canello *et al* 2005). Por todo ello, parece que este aumento en la infiltración de macrófagos podría contribuir al estado de inflamación de bajo grado asociado con la obesidad (Wellen y Hotamisligil 2003, Wellen y Hotamisligil 2005). En esta línea, conocemos que leptina puede promover la diapedesis de macrófagos de la sangre al tejido adiposo (Curat *et al* 2004), así como los adipocitos son capaces de sintetizar y secretar moléculas como el MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos 1), un factor de reclutamiento de monocitos circulantes (Christiansen *et al* 2005).

En definitiva, en la obesidad se desarrolla un estado de inflamación crónica debido a cambios en las funciones de los adipocitos y los macrófagos en el tejido adiposo (Weisberg *et al* 2003, Iacobellis *et al* 2005).

Algunas adipocitoquinas parecen estar más implicadas en la génesis de la inflamación. La leptina, que actúa principalmente sobre el sistema nervioso central para regular el gasto energético e ingesta de alimentos, parece desempeñar un papel relevante en el estado de inflamación de bajo grado observada en la obesidad merced a su similitud estructural a una citoquina como es la interleuquina 6 (Ahima y Flier 2000, Fantuzzi y Faggioni 2000). De hecho, los receptores de leptina pertenecen a la familia del receptor de citoquinas clase I, existiendo varios trabajos donde se describe una mayor respuesta inflamatoria asociada a la presencia de hiperleptinemia (Loffreda *et al* 1998, van Dielen *et al* 2001). Además, la leptina estaría implicada en la producción de TNF- α y en la activación de macrófagos (Loffreda *et al* 1998). Es de reseñar que se ha documentado una correlación entre los niveles sanguíneos de leptina y de proteína C reactiva (PCR) (Nakamura *et al* 2013, Stakos *et al* 2014, Hribal *et al* 2014). Todos estos hallazgos apuntan a una implicación de leptina en la génesis y mantenimiento del estado inflamatorio observado en individuos obesos.

La adiponectina puede modular la respuesta inflamatoria inducida por TNF- α , producido a su vez por el tejido adiposo, macrófagos y células endoteliales, y que participa en varios procesos fisiológicos relacionados con la respuesta a injurias de agentes exógenos y a infecciones (Borst 2004). Así, se ha demostrado que la adiponectina influye en la reducción de la secreción de TNF- α por parte de los macrófagos (Ouchi *et al* 2000). Este efecto anti-TNF- α puede explicar, en parte, el efecto anti-inflamatorio y anti-aterogénico atribuido a adiponectina. Por el contrario, tanto TNF- α como IL-6 reducen la expresión del ARNm de adiponectina en el adipocito humano (Bruun *et al* 2003). Este hallazgo explicaría el mecanismo por el cual estas dos citoquinas favorecerían la aparición

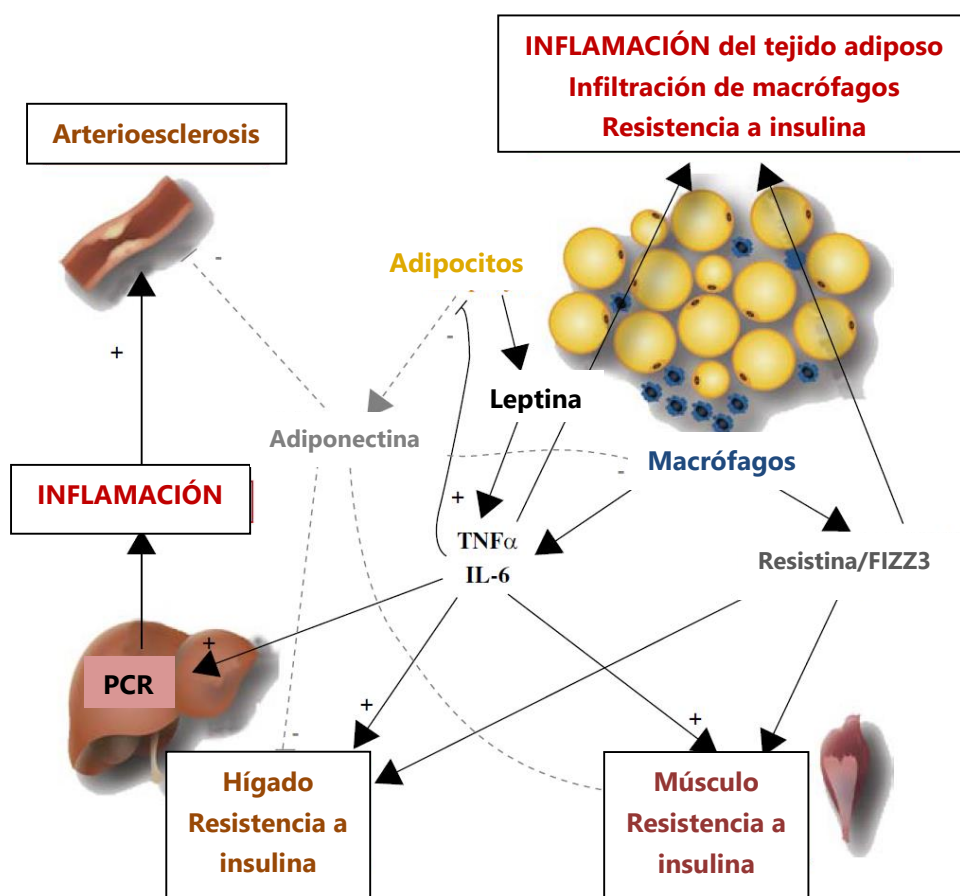
de resistencia a la insulina. Además, se ha documentado una asociación negativa de adiponectina con PCR en niños y adolescentes con diabetes mellitus tipo 1 (Stakos *et al* 2014).

Actualmente, es bien sabido que la producción de IL-6 por parte del tejido adiposo se incrementa en estados de exceso de peso (Fried *et al* 1998, Bastard *et al* 2002). Se estima que entre un 15 y un 30% de los niveles circulantes de IL-6 derivan de la producción de tejido adiposo en ausencia de una inflamación aguda (Mohamed-Ali *et al* 1997). La secreción es más elevada en el tejido adiposo visceral que en el tejido adiposo subcutáneo (Fried *et al* 1998, Fain *et al* 2004). Por consiguiente, la expresión del mRNA de la IL-6 es mayor en tejido adiposo visceral (Fried *et al* 1998). Sin embargo, en el tejido adiposo, la mayor proporción de IL-6 no es producida por adipocitos maduros sino por preadipocitos, células endoteliales y monocitos-macrófagos (Fain *et al* 2004). Una de los principales efectos de IL-6 es la inducción hepática de PCR (Ridker 2003), existiendo una fuerte relación entre el contenido de IL-6 en el tejido adiposo y los niveles de circulantes de IL-6 y PCR (Maachi *et al* 2004).

Otros estudios han demostrado que los preadipocitos serían responsables de la secreción de quimioquinas, como las proteínas quimioatrayentes de monocitos 1 (MCP-1), también conocida como ligando de quimioquina 2 (CCL2) (Weisberg *et al* 2006). Además, adipocitos hipertróficos también tendrían la capacidad de secretar MCP-1, que promovería la infiltración de monocitos en el tejido adiposo donde se diferencian en macrófagos y, a su vez, favorecerían la respuesta inflamatoria mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias (Xu *et al* 2015). Esta infiltración de macrófagos, derivados de la médula ósea, en el tejido adiposo, se produce a través de la unión de MCP-1 al receptor CCR2 y, todo ello, contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina. Esta asociación se ha observado en estudios en ratones con déficit de MCP-1 y CCR2, en la que se observa una atenuación de la inflamación en el tejido adiposo en paralelo a una mejoría de la sensibilidad a insulina (Weisberg *et al* 2006, Kanda *et al* 2006).

En la figura 1 aparece un esquema de cómo estas moléculas son secretadas e interactúan en los distintos órganos para favorecer el desarrollo de un estado inflamatorio crónico, que entre otras consecuencias, favorece la aparición de arterioesclerosis y resistencia a insulina en individuos obesos.

Figura 1. Secreción y regulación de adipocinas por el tejido adiposo en sujetos obesos (adaptado de Bastard *et al* 2006).



Líneas continuas (señalización activada en individuos obesos)

Líneas discontinuas (señalización desactivada en individuos obesos)

3. PROTEÍNA C REACTIVA

3.1. Características de la Proteína C reactiva

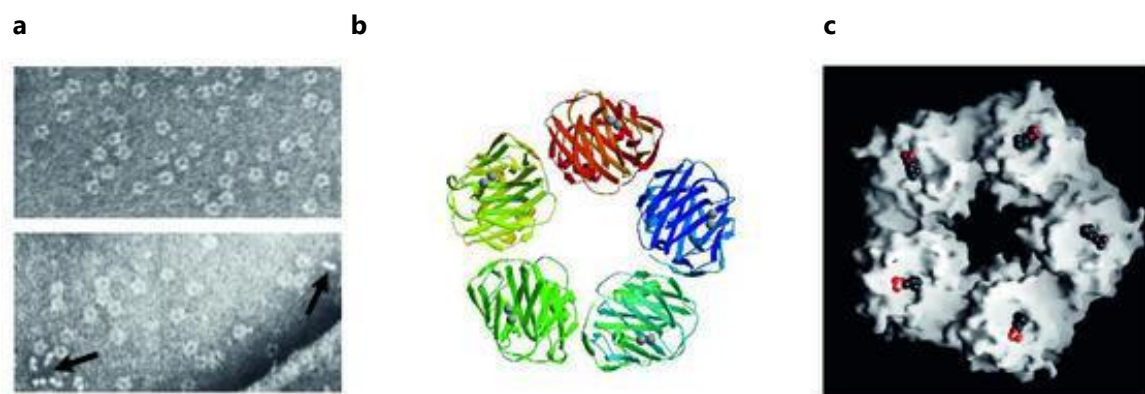
La Proteína C reactiva (PCR) fue descubierta originalmente por *Tillett y Francis* en 1930 como una sustancia en el suero de pacientes con inflamación aguda que reaccionaba con el polisacárido C del neumococo (*Tillett y Francis* 1930).

Es una proteína de 224 residuos con forma de disco pentamérico anular. A las proteínas con este tipo de configuración que se les conoce como pentraxinas. La PCR es un poco distinta, ya que tiene 10 subunidades que forman dos discos pentaméricos, con una masa molecular de 25.106 Da. Procede de la familia de proteínas pentaméricas dependientes de calcio. Cada subunidad contiene dos átomos de calcio y se une a residuos de fosfocolina (*Pepys y Hirsfield* 2003) (Figura 2).

La PCR es sintetizada principalmente por el hígado, y se sabe que citoquinas liberadas por el tejido adiposo, principalmente IL-6, favorecen la síntesis hepática de la PCR (*Heinrich et al* 1990) y, por otro lado, otras citoquinas como IL-1 y TNF- α inducen la expresión hepática de ARNm de la PCR (*Yudkin et al* 1999).

Curiosamente, se ha documentado que el tejido adiposo puede ser una fuente adicional de PCR (*Lau et al* 2005), y la expresión de ARNm de PCR en tejido adiposo humano ha sido confirmada en algunos trabajos (*Ouchi et al* 2003, *Anty et al* 2006, *Memoli et al* 2007). No obstante, desconocemos el significado fisiopatológico de estos hallazgos, así como la influencia que pueda tener sobre los niveles sanguíneos de PCR.

Figura 2. Estructura molecular y morfológica de la PCR humana. a) Fotografía tomada mediante microscopio electrónico. b) Estructura cristalográfica. c) Modelo espacial (tomado de Pepys y Hirschfield 2003).



3.2. Proteína C reactiva y enfermedad cardiovascular

La proteína C reactiva es un marcador de inflamación que participa en la activación de todas las etapas de la aterosclerosis (Lau *et al* 2005, Yeh 2005). Se ha demostrado que procesos patológicos relacionados con el desarrollo de la arteriosclerosis comienzan a temprana edad de la vida (Berenson *et al* 1002, Tuzcu *et al* 2001); así, la PCR puede ser un potencial biomarcador para la detección temprana de sujetos en riesgo.

A mediados de la década de los años 40, *McCarty y Avery* describieron la PCR como un reactante de fase aguda que se producía como respuesta a estímulos inflamatorios incluyendo la inflamación del miocardio que se produce durante la fiebre reumática (McCarty y Avery 1946).

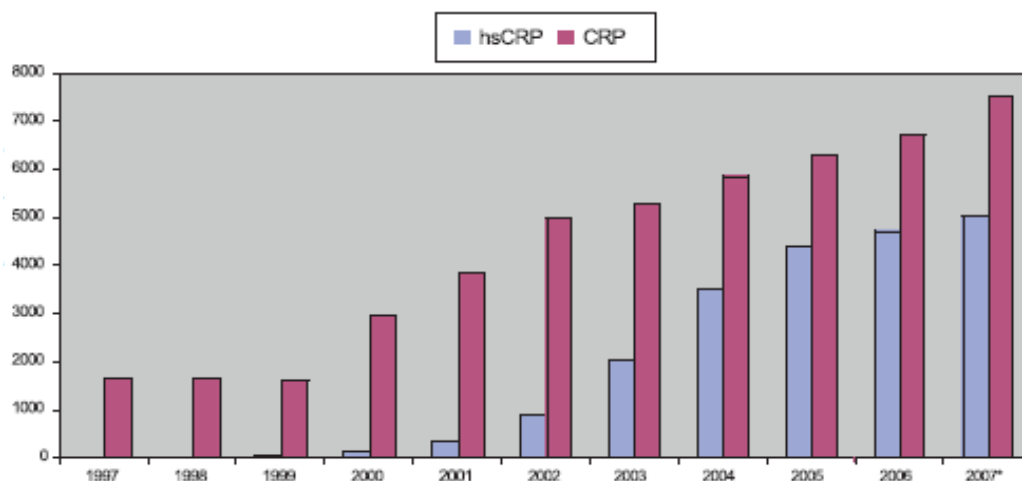
En la década siguiente, se publicaron más estudios que mostraban aumentos de la PCR tras la producción de isquemia miocárdica aguda y necrosis (Anderson y McCarty 1950). Sin embargo, no fue hasta mediados de los años 90 cuando resurgió el interés cardiovascular en esta proteína merced a la publicación

de elevaciones de PCR en pacientes con síndromes aterotrombóticos agudos (Leadbeatter *et al* 1990).

La PCR es una proteína que refleja la presencia de otros mediadores de la inflamación como la interleukina-6 y el factor de necrosis tumoral- α (Pearson *et al* 2003). Se ha demostrado que incrementos ligeros en las concentraciones de PCR, dentro del intervalo de referencia, se asocian a eventos coronarios futuros en personas aparentemente sanas, y para demostrar estos cambios deben emplearse procedimientos muy sensibles, lo que se conoce como PCR de alta sensibilidad (PCRas) (Yeh y Willerson 2003).

El interés creciente en la utilidad pronóstica de PCRas en la evaluación del riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV), en individuos aparentemente sanos, ha supuesto que el número de determinaciones de esta molécula en USA haya aumentado considerablemente (Young y Rifai 2009). De hecho, desde 1988 se observa un aumento exponencial tanto en la utilización de los ensayos tradicionales como en los de alta sensibilidad en la evaluación del riesgo de ECV (figura 3).

Figura 3. Tendencias en la medición de la PCR en los Estados Unidos por el uso de métodos tradicionales y de alta sensibilidad (modificado de Young y Rifai 2009).



La concentración sanguínea de PCR es muy baja en individuos saludables. Así, se considera un valor normal de PCR aquel $\leq 1\text{mg/l}$. Estos valores aumentan considerablemente ante la presencia de procesos inflamatorios sistémicos, infecciones, enfermedades autoinmunes y cáncer (Yeh y Willerson 2003). Si las concentraciones de PCR no disminuyen al cabo de un tiempo, ya hablamos de una inflamación crónica que se puede evaluar de manera más precisa con la cuantificación de PCR de alta sensibilidad (PCRas), que es muy útil como predictor de riesgo de enfermedades cardiovasculares. De esta forma hombres y mujeres con valores PCRas $<1\text{mg/l}$ poseen bajo riesgo de enfermedad cardiovascular, PCRas con valores entre 1 y 3 mg/l indican riesgo moderado y PCR $>3\text{mg/l}$ revelan valores con alto riesgo de enfermedad cardiovascular futura (Yeh 2005, Ridker y Cook 2004, Ridker 2016).

La PCRas se encuentra íntimamente relacionada con la aterosclerosis, pues los conocimientos actuales sugieren que, como marcador sensible de inflamación, las diferencias en las concentraciones de PCRas observadas entre los pacientes con mayor riesgo de ECV podrían reflejar la actividad inflamatoria del ateroma, y la vulnerabilidad de la lesión, así como la inestabilidad y ruptura de la placa (Ammirati *et al* 2015). De esta manera, al producir disfunción endotelial, favorece la agregación plaquetaria por medio del PAI-1 y provoca la acumulación de macrófagos en las placas ateroscleróticas (Lau *et al* 2005). En esta misma línea, estudios recientes demuestran que la PCR puede disminuir los niveles de ARNm de la sintetasa endotelial de óxido nítrico (eNOS) y participar en la regulación de varias moléculas de adhesión y quimioquinas, destapando un fenómeno proinflamatorio y proaterosclerótico. Observaciones preliminares también sugieren la participación en la regulación de la señal del factor nuclear B (NF κ B) en células endoteliales mientras que atenúa la supervivencia y diferenciación de las células progenitoras endoteliales. Además, se ha demostrado que la PCR

regula el receptor de la angiotensina 1 (AT1-R) en células musculares lisas vasculares *in vivo* e *in vitro*, aumentando la proliferación del músculo liso vascular, migración, producción de especies de oxígeno reactivas y reestenosis (Ammirati *et al* 2015).

En consecuencia, la PCRas parece comportarse como un buen marcador de disfunción endotelial (Szmitko *et al* 2003). En esta línea, estudios poblacionales han demostrado que los valores basales de PCRas predicen futuros episodios de enfermedad cardiovascular de forma independiente de la presencia de otros factores de riesgo tradicionales, de modo que tanto hombres como mujeres con PCRas elevada tienen un riesgo cardiovascular aumentado (Pearson *et al* 2003).

Estudios en niños demostraron que la concentración de PCR se asoció con el grosor de la capa íntima-media en niños finlandeses (Järvisalo *et al* 2002). Y en la literatura científica apuntan a la utilidad de PCRas como un marcador de utilidad de riesgo cardiovascular en niños obesos (Guran *et al* 2007, Soriano-Guillén *et al* 2008).

3.3. Proteína C reactiva y su asociación con obesidad infantil

Como se ha comentado anteriormente, las enfermedades cardiovasculares tienen su origen en la infancia, relacionándose con la presencia de factores de riesgo cardiovascular tales como pueden ser la presencia de obesidad, hipertensión arterial, dislipemia o diabetes (Abate 2000). Además, ya en niños, la obesidad, fundamentalmente de origen visceral, induce un estado inflamatorio crónico, de bajo grado (Maffeis *et al* 2007), que favorece la aparición de resistencia a la insulina y síndrome metabólico (Wärnberg y Marcos 2008). Por todo ello, resulta de sumo interés el estudio de la PCR como factor de riesgo o marcador de enfermedad cardiovascular en etapas infantiles.

Una de las primeras descripciones de una posible relación entre obesidad e inflamación en niños fue desarrollada por el equipo de *Cook y colaboradores* en el año 2000 en 699 niños prepuberales, documentando que los niveles de PCR eran 270% más altos en los niños que presentaban un índice ponderal más elevado comparado con los del nivel inferior (*Cook et al 2000*).

Es reseñable que los niños de raza no caucásica presentaban niveles más altos de PCR que los caucásicos, siendo 2,04 veces mayores estos niveles en los niños de origen surasiático (*Cook et al 2000*). Este hallazgo también fue observado en niños hispanoamericanos procedentes del estudio NHANES IV donde se observó que niños y niñas con sobrepeso mostraban 3,74 y 3,17 veces mayor probabilidad de tener niveles más altos de PCR que los niños con normopeso y que el IMC fue el mejor predictor de los niveles sanguíneos de PCR (*Visser et al 2001, Ford 2003*). Estos datos apuntan a una mayor proporción de masa grasa, así como de tejido adiposo visceral en estas poblaciones (*WHO Expert Consultation 2004*).

Con posterioridad, diversos estudios han demostrado que los niños obesos presentan niveles significativamente más altos de PCR que los controles (*Valle Jiménez et al 2007, Oliveira et al 2009, Mauras et al 2010, Nappo et al 2013*). Así mismo, se ha demostrado una relación significativa, independiente del IMC, entre los niveles de PCRas y niveles de c-HDL y triglicéridos (*Soriano-Guillén et al 2008*). *Matsuo y colaboradores* resaltaron la asociación de niveles altos de PCR y bajos niveles de c-HDL en pacientes con antecedentes de enfermedad cardiovascular (*Matsuo et al 2008*). Mientras que Oda establece el punto de corte de PCR > 0,65 mg/l como factor de riesgo de síndrome metabólico, enfermedad cardiovascular y esteatohepatitis no alcohólica (*Oda 2008*).

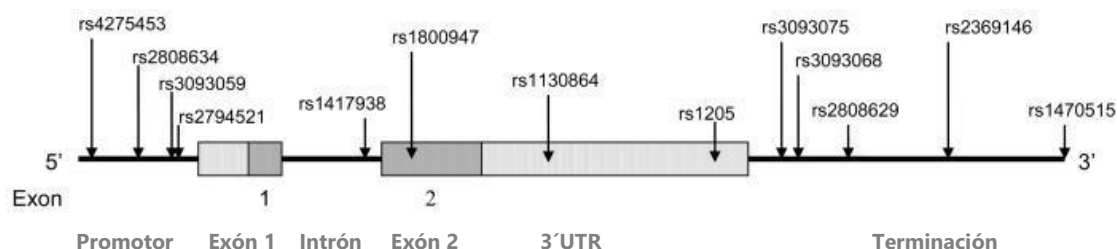
4. GEN DE LA PCR Y SUS VARIANTES POLIMÓRFICAS

4.1. Polimorfismos del gen de PCR y asociación con niveles de PCRs

El gen de la PCR está localizado en el cromosoma 1 (1q21-1q23), tiene un tamaño de 1,9 KB y contiene dos exones y un intrón (Danik y Ridker 2007).

Tal y como se observa en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) *SNP Database* (Figura 5) en el gen de la PCR se han descrito un número importante de polimorfismos de un solo nucleótido o *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), alguno de los cuales se muestra en la figura 4.

Figura 4. Estructura del gen de la PCR y posición de los SNPs más estudiados (Adaptado de Lee *et al* 2009).



Cajas oscuras son exones, cajas claras son regiones 5' y 3' no traducidas

Polimorfismos en distintas localizaciones del gen se han asociado con niveles de PCR (tabla 3). Dentro de la región promotora del gen los SNPs más estudiados y asociados con niveles de PCR son, rs2794521 (A>G) (Chen *et al* 2005, Carlson *et al* 2005, Wang *et al* 2009, Kotlega *et al* 2014), rs3091244 es un SNP trialélico C>T>A (Kathiresan 2006, Danik y Ridker 2007). En la región exónica, primordialmente en el exón 2, donde el polimorfismo más estudiado es rs1800947 (G>C) (Russell *et al* 2004, Balistreri *et al* 2006, Suk *et al* 2005, El-Aziz *et al* 2013) y la región no codificante 3'UTR terminal, donde igualmente se han

estudiado numerosos polimorfismos, dentro de los cuales los más estudiados son rs1205 (G>A), rs1130864 (C>T) (Russell *et al* 2004, Martínez-Calatrava *et al* 2007), rs3093066 (C>A) (Obisesan *et al* 2004) y rs3093068 (C>G) (Kardys *et al* 2006).

En la tabla 3 se muestran varios de estos polimorfismos clasificados según la posición que ocupan dentro del gen *PCR*, así como estudios de asociación.

Tabla 3. Polimorfismos del gen *PCR* y asociación con niveles de *PCR*.

Región Genética	Posición común SNP	Cambio nucleótido	NCBI refSNP ID	Nucleótido asociado con altos niveles de <i>PCR</i>	Estudios de asociación con variaciones de niveles de <i>PCR</i>
Promotor	-757 -717 -409 -390	T>C A>G G>A C>T>A	rs3093059 rs2794521 rs3093062 rs3091244	T A G T	Zee 2004 Lange 2006 Kovacs 2005, Chen 2005 Szalai 2005 Kathiresan 2006, Danik 2007
Intrón	+29	A>T	rs1417938	A	Suk 2005, Miller 2005
Exón 2	+1059	G>C	rs1800947	G	Russell 2004, Balistreri 2006
3'UTR	+219 +1444 +2147 +2911	C>A C>T G>A C>G	rs3093066 rs1130864 rs1205 rs3093068	C T G C	Obisesan 2004 Brull 2003, D'Aiuto 2005 Russell 2004, Miller 2005 Kardys 2006

Esta asociación de SNPs en el gen de *PCR* con niveles plasmáticos elevados de *PCR* se ha documentado igualmente en una cohorte de jóvenes filipinos (Curocichin *et al* 2011). También es de reseñar que ciertos polimorfismos en el gen de la *PCR* parecen condicionar diferencias en niveles de *PCR* a lo largo de la vida (Kivimäki *et al* 2007).

4.2. Otras variantes polimórficas asociadas con niveles de PCR

Sin embargo, los polimorfismos de PCR no explican en su totalidad las variaciones en los niveles de PCR atribuidos a factores genéticos, ya que se han identificado, hasta la fecha, siete locus asociados con niveles plasmáticos de PCR (Hribal *et al* 2014).

Algunas de las variantes genéticas del gen *LEPR*, han demostrado un importante papel en el desarrollo de la obesidad y la inflamación de bajo grado asociada con niveles de PCRas tanto en adultos como en jóvenes (Zhang *et al* 2007, Bochud *et al* 2009, Elliott *et al* 2009, Curocichin *et al* 2011). El polimorfismo rs1805096 del gen de *LEPR* presenta una asociación con PCR, donde los sujetos homocigotos para el alelo mayoritario presentan un 32% de valores más elevados de PCR que los individuos que no lo portan (Zhang *et al* 2007).

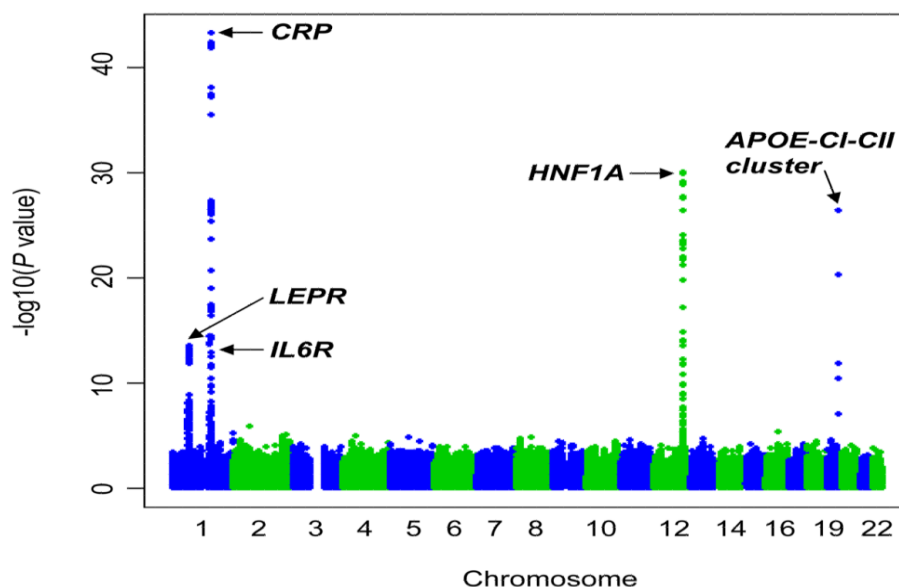
El genotipo de Apo E afecta a los niveles de PCR incluso en población infantil y juvenil, de modo que los varones portadores del alelo E4 presentan valores más bajos de PCR (Grönroos *et al* 2008).

Variantes génicas del receptor de IL-6 (*IL6R*) han sido relacionadas de forma significativa con niveles plasmáticos de PCR, independientemente de los niveles de IL-6, pudiendo predecir riesgo de diabetes, como el polimorfismo rs8192284 del gen de *IL6R* que se asoció significativamente con niveles de PCR en mujeres diabéticas (Qi *et al* 2009).

Un estudio en adultos jóvenes filipinos (21-22 años) pone de manifiesto que varios SNPs, rs1892534, rs769449, rs2228145, pertenecientes a los genes *LEPR*, *APO E* y *IL6R* respectivamente, se asocian con niveles de PCR (Curocichin *et al* 2011).

De hecho, existen estudios de asociación de genoma completo o *Genome-wide association study* (GWAS) que relacionan SNPs de varios loci con niveles de PCR (Elliot *et al* 2009) (figura 5).

Figura 5. Análisis de asociación del genoma completo o GWAS con niveles de PCR en 9 cohortes. Manhattan plot (tomado de Elliot *et al* 2009).



4.3. Polimorfismos de PCR y enfermedad cardiovascular

Además de relacionarse con niveles de PCR, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen de la PCR se han asociado con factores de riesgo cardiovascular y con mayor incidencia de infarto de miocardio (Shen *et al* 2013). En población china, polimorfismos del gen de PCR se han relacionado con hipertensión (Zhao *et al* 2013).

En un estudio que examina la relación de rs1800947 con niveles sanguíneos de PCR y riesgo de trombosis arterial en hombres sanos americanos, se encontró que un 12% de los sujetos que portaban el alelo C tenían valores más bajos de PCR que los portadores del alelo G, no existiendo correlación con la aparición de

trombosis (Zee y Ridker 2002). Lo mismo ocurrió en un estudio británico de mujeres y salud cardiovascular en el que las portadoras de rs1800947 (C) mostraron niveles inferiores de PCR, pero no mostraron cambios en las cifras de tensión arterial (Davey Smith *et al* 2005). Por contra, Balistreri y colaboradores mostraron que los niveles sanguíneos de PCR fueron más elevados en pacientes portadores de alelo C y con un historial de infarto de miocardio, en comparación con un grupo control (Balistreri *et al* 2006).

En un estudio en población china, aunque no se encontró correlación de rs2794521 con niveles de PCR, la frecuencia del alelo A fue significativamente más elevada en pacientes con enfermedad coronaria que en controles sanos (Chen *et al* 2005). En otro estudio del *Third National Health and Nutrition Examination Survey* (NHNES III), varios polimorfismos de PCR, fueron estudiados con niveles de PCR, pero solo el SNP trialélico -390C/T/A fue relacionado con valores de PCR y con un aumento en la prevalencia de enfermedad coronaria (Crawford *et al* 2006).

Más recientemente, polimorfismos del gen de PCR se han utilizado para diseñar haplotipos y, de esta forma, estudiar su relación con niveles sanguíneos de PCR y enfermedad coronaria, sin encontrar asociación alguna (Kardys *et al* 2006, Wang *et al* 2006).

Otro estudio observó que la obesidad influye en los niveles de PCR y esto depende de las combinaciones de los distintos genotipos y haplotipos del gen *PCR*, lo que conlleva importantes implicaciones para la predicción de la enfermedad aterosclerótica (Teng *et al* 2009).

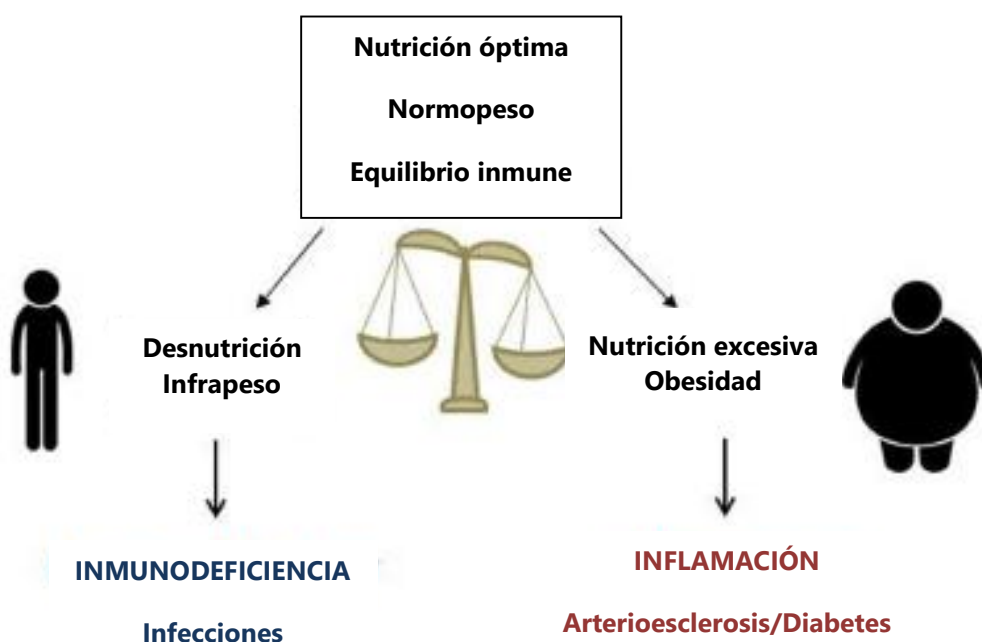
5. FACTORES DIETÉTICOS E INFLAMACIÓN CRÓNICA DE BAJO GRADO

5.1. Dieta y respuesta inmune

La dieta es un importante factor regulador de la respuesta inmune de tal forma que la aparición de un desequilibrio metabólico conduce a una inestabilidad inmunológica. Así, la desnutrición favorece la alteración del sistema inmune e incrementa la susceptibilidad a infecciones y, por otra parte, la obesidad alcanzada por una nutrición inadecuada y en muchas ocasiones excesiva conduce a una immunoactivación que aumenta el riesgo de enfermedades de origen inflamatorio, tales como la arteriosclerosis y la diabetes mellitus tipo 2 (Wellen y Hotamisligil 2005, Gerriets y MacIver 2014).

Las células T junto con la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo, promueve la aparición de un estado inflamatorio y resistencia a insulina (Gerriets y MacIver 2014). Por lo tanto, una nutrición óptima es necesaria para un equilibrio inmune saludable (figura 6).

Figura 6. Balance inmune entre desnutrición y obesidad (modificado de Gerriets y MacIver 2014).



Existen evidencias que sugieren que algunos alimentos, nutrientes y componentes no nutricionales de la alimentación pueden modular una respuesta inflamatoria tanto de forma aguda como crónica (Calder *et al* 2013). Por el contrario, en otros trabajos, los niveles de estas moléculas inflamatorias no se ven influenciados por diferentes modelos dietéticos (Rajaie *et al* 2013). En consecuencia, a día de hoy, existe cierta controversia al respecto.

5.2. Principios inmediatos implicados en inflamación de bajo grado

Hidratos de Carbono (CH) o carbohidratos

Los carbohidratos constituyen la fuente primordial de energía procedente de la dieta. Podemos clasificar los carbohidratos en simples y complejos:

- Los carbohidratos simples son aquellos que tienen una estructura química que se compone de uno (monosacáridos: galactosa, fructosa y glucosa) o dos azúcares (disacáridos: lactosa, maltosa y sacarosa). Son digeridos por el cuerpo muy rápidamente y tienen muy poco valor nutritivo (Suter 2005). Algunos ejemplos de alimentos que contienen hidratos de carbono simple son los azúcares de mesa, chucherías, refrescos, zumos de frutas no naturales, mermelada, entre otros. Estudios experimentales han documentado que la ingesta de carbohidratos simples ha sido relacionada con una respuesta proinflamatoria (Oliveira *et al* 2013, Jonasson *et al* 2014). Por ello, se recomienda restringir su consumo.

- Los carbohidratos complejos están formados por tres o más azúcares, y se dividen en oligosacáridos y polisacáridos. Los oligosacáridos están compuestos por menos de diez monosacáridos y son importantes para la absorción de minerales y para la formación de ácidos grasos. Los polisacáridos están constituidos por diez o más monosacáridos. Por tanto, son más complejos que

los oligosacáridos. Dentro de este subgrupo de polisacáridos, destacaríamos la celulosa, el almidón y el glucógeno. Debido a su complejidad tardan más tiempo en ser digeridos por lo que no aumentan los niveles de glucosa en sangre de forma tan rápida como los simples (Suter 2005). Estos CH complejos se encuentran principalmente en verduras, pan integral y cereales (Jonasson *et al* 2014). Varios estudios han descrito como estos CH complejos disminuyen el estado proinflamatorio en individuos obesos (Suter 2005). Por todo ello, es recomendable fomentar su consumo.

La calidad de estos principios inmediatos se evalúa por varios índices: a) el *Índice Glucémico* (IG): valora la elevación de la glucosa postprandial en sangre en términos de rapidez de elevación y de duración de la misma. Así, disponemos de carbohidratos con elevado IG que indica que tras la toma de estos alimentos los valores de glucosa postprandial se elevan de forma clara y rápida. El ejemplo característico son los azúcares refinados (simples). Frente a ellos, están los carbohidratos con bajo IG, los realmente aconsejables (carbohidratos complejos), que producen menor elevación de la glucosa postprandial, pero de forma más duradera en el tiempo (Jenkins *et al* 1981); b) la *Carga Glucémica* (CG): es una medida que tiene en cuenta tanto la calidad como la cantidad de los carbohidratos de la dieta (Salmerón *et al* 1997).

Algunos estudios transversales han demostrado una asociación entre IG/CG de la dieta y citoquinas inflamatorias (Levitan *et al* 2008, Du *et al* 2008, Qi *et al* 2006, Pischon *et al* 2005). De esta forma, quintiles más altos de IG y CG fueron relacionados significativamente con los niveles más elevados de PCR en sangre (Levitan *et al* 2008, Du *et al* 2008). Curiosamente, varios ensayos clínicos aleatorizados no han demostrado una asociación entre estos índices y citoquinas inflamatorias como PCR, TNF- α y IL-6 (Pittas *et al* 2006, Shikany *et al* 2009). No obstante, en otro estudio donde se aplicó una restricción energética de un 30% en individuos adultos con sobrepeso que tenían elevada CG, se produjo un

declive significativo en los valores sanguíneos de PCR (Vrolix y Mensink 2010). Estudios más recientes relacionan una bajada de PCRas e IL-6 en paralelo a una disminución de IG/CG de la dieta (Buyken *et al* 2014).

Fibra dietética

La *American Association of Cereal Chemists* define la fibra como la parte comestible de la planta o hidratos de carbono análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado, con fermentación completa o parcial en el intestino grueso (AACC 2001). En función de su solubilidad se puede distinguir en fibra insoluble y fibra soluble. Dentro de la fibra insoluble destaca: celulosa, algunas hemicelulosas, lignina y almidón resistente. En cuanto a la fibra soluble, está constituida por parte de hemicelulosas, gomas, mucílagos, pectinas y fibra prebiótica como la inulina y los fructooligosacáridos (AACC 2001). Esta fibra prebiótica es la que favorece el desarrollo de una microbiota intestinal beneficiosa para el correcto funcionamiento de nuestro organismo, y contrarrestar la enfermedad inflamatoria intestinal (Wong *et al* 2016). Los alimentos que contienen fibra poseen un índice glicémico menor que el de los alimentos equivalentes refinados, manteniendo una mejor regulación de la respuesta glucémica (Nilsson *et al* 2008). Todas estas acciones se traducen en efectos positivos y preventivos de trastornos como estreñimiento, obesidad, arterioesclerosis y patologías como enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, síndrome de colon irritable y algunos tipos de cáncer, sobre todo el cáncer de colon (Escudero Alvarez y González Sánchez 2006, Aleixandre y Miquel 2008).

Se ha documentado en varios estudios que consumos más elevados de fibra en la dieta bajaron los niveles de marcadores inflamatorios, entre ellos, la PCR (Estruch *et al* 2009, Buyken *et al* 2014). En otros trabajos en los que se diseñó una

intervención nutricional con el objetivo de disminuir el peso, se constató que los niveles significativamente disminuidos de PCR se relacionaban con incrementos en el consumo de fibra (North *et al* 2009). Además, se ha descrito que una ingesta o suplemento de fibra mayor de 30g/día contribuye a disminuir los valores de PCR de forma significativa (Bernaud *et al* 2014, King *et al* 2007). En niños y adolescentes, las recomendaciones dietéticas de fibra van de 10 a 40 g/día variando por países y dependen de la edad, sexo e ingesta energética; así esta ingesta va aumentando con la edad y es mayor en niños (Edwards *et al* 2015).

La baja ingesta de fibra durante etapas tempranas de la vida parece estar asociada a largo plazo con efectos adversos, incluyendo la aparición de obesidad en la edad adulta (Aggett *et al* 2003). Todo ello apunta a un papel antiinflamatorio del consumo de fibra. No obstante, se necesita el diseño de nuevos estudios de intervención nutricional con mayor número de pacientes que valore la influencia del consumo de fibra sobre la inflamación teniendo en cuenta la existencia de una variabilidad individual sobre el efecto antiinflamatorio.

Ácidos grasos

Los ácidos grasos en la dieta incluyen los monoinsaturados, poliinsaturados (PUFA), saturados y trans.

-Los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) presentan un doble enlace carbono-carbono en su estructura y su consumo favorece la disminución del colesterol total y LDL-c. El principal representante es el ácido oleico (C-18) presente en el aceite de oliva, el cual se ha asociado con una reducción de los niveles de PCR (Yoneyama *et al* 2007).

-Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) poseen dos o más dobles enlaces en su estructura, son componentes imprescindibles de las membranas celulares y precursores de las prostaglandinas (moléculas mediadoras de la

inflamación), son esenciales porque no los sintetiza el organismo, hay que incorporarlos en la alimentación y se encuentran fundamentalmente en alimentos de origen vegetal, a excepción de los pescados y mariscos (FAO). Existen dos grupos: omega 6 (dos dobles enlaces en la posición 6 o n-6) y omega 3 (tres dobles enlaces en la posición 3 o n-3). El ácido linoléico es el ácido graso esencial primario o generador de la familia n-6, el ácido α -linolénico es el ácido graso esencial primario o generador de la familia n-3 (FAO). Son precursores de eicosanoides, los cuales, a su vez, juegan un importante papel en la respuesta inmune (Lee y Hwang 2008). Así, se ha documentado efectos antiinflamatorios de PUFA omega 3 en estudios transversales (Lopez-García *et al* 2004, Zampelas *et al* 2005). Estudios animales han demostrado que el aceite de pescado rico en n-3 PUFA, suprime la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de los macrófagos y un suplemento dietético de aceite de pescado en voluntarios sanos conlleva a un descenso en monocitos y neutrófilos (Calder *et al* 2011). El ácido araquidónico n-6 PUFA, es el precursor de prostaglandinas, leucotrienos y otros componentes, los cuales cumplen un papel fundamental en la inflamación y la regulación de la inmunidad (Calder *et al* 2011).

Por otra parte, intervenciones nutricionales en las que se suplementa con aceite de pescado, que contienen PUFA, han mostrado disminución de los niveles de PCR y IL-6 en mujeres sanas postmenopáusicas (Ciubotaru *et al* 2003).

-Los ácidos grasos saturados, no poseen dobles enlaces en su cadena y aumentan los niveles de colesterol más que cualquier otro tipo de grasas, además de tener un efecto trombogénico y de riesgo cardiovascular que se disminuye al reducir estos ácidos grasos y reemplazarlos por grasas de tipo insaturado en la dieta (Hooper *et al* 2015). Se encuentran en alimentos de origen animal, a excepción del aceite de coco y palma. Las grasas trans o hidrogenadas, que se encuentran en productos industriales elaborados tales como bollería y alimentos precocinados son más perjudiciales, si cabe, que las saturadas. Su consumo se

asocia a incremento de enfermedades coronarias (De Souza *et al* 2015). Así, parece existir una asociación significativa entre el consumo de grasas trans y la respuesta inmune, como se ha documentado en un estudio donde el alto quintil de consumo de ácidos trans fue relacionado con elevados niveles de PCR y IL-6 (Lopez-Garcia *et al* 2005).

Vitaminas

Las vitaminas son compuestos orgánicos (contienen al menos un átomo de carbono) que cumplen funciones vitales relacionadas con el metabolismo y con la fabricación de hormonas, neurotransmisores, células sanguíneas o material genético y poseen función enzimática acelerando reacciones químicas (Portela 1994). Se clasifican en:

-Vitaminas hidrosolubles, que son aquellas que se disuelven en agua. Y la mayoría de ellas no pueden ser almacenadas en el organismo por lo que deben ser aportadas continuamente por la nutrición. Son las vitaminas del grupo B: B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), B5 (ácido pantoténico), B6 (piridoxina), B8 (biotina), B9 (ácido fólico), B12 (cobalamina). Estas vitaminas se encuentran en pescados, carnes, huevo, verduras, frutas y legumbres. Por otra parte, hay que recordar a la vitamina C (ácido ascórbico) importante en la formación de colágeno y presente en cítricos, frutas, hortalizas, leche y carne.

-Vitaminas liposolubles, aquellas solubles en lípidos y presentes en la parte grasa de los alimentos y si se acumulan pueden producir toxicidad. Entre ellas se encuentra la vitamina A (o retinol) que se encuentran en verduras y hortalizas de color rojo o naranja por tener carotenos que le dan este color; vitamina D, fundamental para la absorción del Calcio en el hueso, se obtiene de la dieta y por síntesis cutánea mediante exposición a radiación solar; vitamina E, es un antioxidante presente en aceite vegetales y en frutos secos; vitamina K,

importante en la síntesis de factores de coagulación sanguínea, es sintetizada por bacterias de la flora intestinal y muy presente en las verduras de hoja verde y las leguminosas (Oliveira Fuster 2000).

La relación de vitaminas en la dieta con la bajada de marcadores inflamatorios como es la PCR se ha descrito fundamentalmente en relación a la ingesta de vitaminas antioxidantes, como son la vitamina A, C y E (Wannamethee *et al* 2006, Oliveira *et al* 2009). En individuos con exceso de peso, los niveles circulatorios de carotenoides (provitamina A) son inferiores ya que un alto porcentaje de estos se encuentra almacenado en el tejido adiposo como componente lipídico soluble (Brady *et al* 1996). Se ha documentado que altas concentraciones en plasma de α - y β -caroteno fueron asociados con bajos niveles sanguíneos de PCR (Wang *et al* 2008). Además, valores plasmáticos disminuidos de vitamina C en plasma se relacionan con elevación de PCR en sujetos con obesidad mórbida (Aasheim *et al* 2008). En niños, no todos los estudios encuentran la asociación anteriormente descrita entre vitamina C y PCR (Aeberli *et al* 2006).

5.3. Alimentos implicados en inflamación de bajo grado

Frutas y vegetales

La fruta se compone fundamentalmente de carbohidratos complejos y fibra al igual que los vegetales y las hortalizas, también tienen un aporte importante de vitaminas como la vitamina C y A. Este valor o calidad nutritiva de las frutas y hortalizas, se asocia a su contenido vitamínico y mineral, que son necesarios en muy pequeña cantidad, pero sin cuya ingesta se producen enormes carencias y enfermedades; además nos aportan la mayor cantidad de fibra que requerimos cada día, y otros compuestos, no nutritivos, pero de importancia para la salud, y que en la actualidad denominan "fitoquímicos" (Cámara *et al* 2003).

En numerosos estudios la ingesta de frutas y vegetales se asocia de forma inversamente proporcional a los niveles de PCR, de manera que altos consumos de frutas y verduras se asocian con valores de PCR más bajos, contribuyendo a disminuir el estado de inflamación crónica y ejerciendo un efecto protector de estos alimentos en la salud tanto en individuos adultos (Brighenti *et al* 2005, Esmailzadeh *et al* 2006, Oliveira *et al* 2009) como en niños y adolescentes europeos en los estudios NHANES e IDEFICS (Qureshi *et al* 2009, González-Gil *et al* 2015). Por el contrario, algunos estudios no encontraron asociaciones entre una dieta rica en vegetales y frutas con marcadores inflamatorios (Adiponectina, PCR, IL-6) (Salas-Salvadó *et al* 2008, Freese *et al* 2004, Morand *et al* 2011).

Legumbres, cereales y granos enteros

La ingesta de legumbres (judías, garbanzos, lentejas, guisantes, habas, etc) y cereales (trigo, avena, centeno, arroz, maíz, etc) en la dieta ha sido consistentemente asociada con una reducción del riesgo cardiovascular (Bouchenak *et al* 2013, Souza *et al* 2015). La mayoría de las legumbres contienen compuestos bioactivos como fibra, tocoferoles, compuestos fenólicos, oligosacáridos y fosfolípidos que desempeñan protección contra numerosas enfermedades o trastornos, como enfermedades coronarias, diabetes, hipertensión arterial y la inflamación (Bouchenak *et al* 2013).

Los procesos de estrés oxidativo e inflamatorios se encuentran disminuidos por el consumo de legumbres, cereales y granos enteros (Souza *et al* 2015), de hecho, existen estudios que asocian una reducción de PCR y otras citoquinas inflamatorias asociada a la ingesta de legumbres (Gonzalez-Gil *et al* 2016, Steckhan *et al* 2016).

En la dieta mediterránea las legumbres y los cereales constituyen una base fundamental, existiendo numerosos estudios que asocian niveles más bajos de

PCR debido a consumos elevados de legumbres, cereales y frutos secos en este tipo de dieta (Sofi *et al* 2008, Estruch 2010, Casas *et al* 2014).

En cuanto al consumo de granos enteros, considerados como las semillas o granos de cereales no procesados, existen estudios donde se observa una disminución de los niveles circulantes de radicales libres y de citoquinas proinflamatorias, como IL-6, IL-18, TNF- α y PCR en adultos (Giugliano *et al* 2006) y niños (Qureshi *et al* 2009). Por otro lado, estudios de intervención han encontrado una reducción en la PCR, en individuos que siguieron una dieta rica en granos enteros en comparación con aquellos que siguieron una dieta con granos refinados (Katcher *et al* 2008).

5.4. Índice de Alimentación Saludable e inflamación de bajo grado

El Índice de Alimentación Saludable (IAS), más conocido por sus siglas en inglés HEI (*Health Eating Index*), es un parámetro que nos permite valorar el grado salubridad de una dieta de manera cuantitativa. Este índice fue desarrollado por investigadores del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, y evalúa la cantidad de alimentos ingeridos y los puntúa dependiendo de que los alimentos se consideren saludable, de modo que a más cantidad más puntuación, de manera que cuanto más alta sea la puntuación final más saludable se considerará la alimentación (Kennedy *et al* 1995).

El IAS en 1995 estaba formado por diez componentes dietéticos entre alimentos y nutrientes puntuados de 0 a 10 según el número de porciones para cada nivel de consumo de energía dado, en total suman un máximo de 100 puntos (Kennedy *et al* 1995).

Este índice inicial se ha ido revisando después de cada actualización de las recomendaciones nutricionales (1995, 2005 y 2010), por lo que ya se ha revisado

dos veces más desde 1995 cambiando las puntuaciones asignadas y añadiendo nuevos componentes nutricionales (Guenther *et al* 2008, Guenther *et al* 2013).

De los cambios que se han producido en la evolución de este índice de alimentación saludable, cabe destacar que se ha pasado de recomendar una alta cantidad de cereales a una menor e integrales, los cereales refinados han pasado de puntuar positivamente en 2005 a negativamente en 2010, las grasas dejan de puntuarse negativamente en 2005 y las saturadas dejan de considerarse tan negativas en 2010, el colesterol y la variedad deja de puntuarse en 2005, la carne casi desaparece en la valoración de 2010, centrándose en las proteínas, los vegetales y los mariscos, los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados comienzan a valorarse positivamente en 2010, y los alimentos que aportan calorías vacías o SoFAAS (grasas sólidas, azúcares añadidos y alcohol) puntúan negativamente ya en 2005.

Este índice de alimentación saludable se sustenta en la ingesta dietética de un individuo y depende de la edad y el sexo. Así, presentan índices más elevados las mujeres que los hombres y las personas de edad avanzada (Freedman *et al* 2010).

En países como Brasil, existen estudios donde adaptan el HEI-2005 a sus propios hábitos alimenticios: HEI-B. Así, los datos procedentes de este estudio indican que el HEI-B puede ser un marcador de utilidad para identificar la adiposidad inducida por un estado pro-inflamatorio y de insulino-resistencia en individuos con riesgo metabólico (Monfort-Pires *et al* 2014).

En población iraní, puntuaciones más altas de IAS fueron asociados con hábitos dietéticos más saludables y se encontró una asociación inversa entre IAS y niveles séricos de PCR, Apolipoproteína B y la presión arterial sistólica entre hombre y mujeres (Haghighatdoost *et al* 2013).

El estudio NHANES 2007-2010 analizó la calidad de la ingesta de nutrientes entre niños y adultos (Agarwal *et al* 2015). En este trabajo no hubo diferencias en las puntuaciones totales de HEI-2010 comparando los consumidores de carne y los no consumidores tanto en niños como adultos. Sin embargo, el componente de fruta total fue significativamente más alto en niños y el componente de proteína total, granos y verduras más elevado en adultos (Agarwal *et al* 2015).

Estudios de asociación de IAS con factores inflamatorios como PCR, encuentran una asociación inversa de entre las puntuaciones de IAS y niveles de PCR sanguíneo (Ford 2003, Haghighatdoost *et al* 2013, Monfort-Pires *et al* 2014, Ko *et al* 2016). Por componentes, el consumo de granos fue inversamente relacionado con elevados niveles de PCR, sugiriendo que una mayor ingesta de granos puede atenuar la inflamación (Ford 2005).

5.5. Patrones dietéticos y su relación con PCR

Los patrones dietéticos son particularmente interesantes, en cuanto a los niveles circulatorios de PCR se refiere. La relación de determinados nutrientes y alimentos, por ejemplo, vegetales y fruta, así como vitaminas antioxidantes y ácidos grasos como el omega 3, en relación a las concentraciones de PCR ha sido examinado en muchos estudios, con distintos resultados (Centritto *et al* 2009, Nanri *et al* 2011, Barbaresko *et al* 2013, Lee *et al* 2014).

De hecho, se ha establecido un patrón dietético saludable, rico en frutas y verduras, que parece disminuir los niveles de moléculas inflamatorias como la PCR (Centritto *et al* 2009, Barbaresko *et al* 2013). También se ha descrito un patrón dietético occidental, sustentando en el consumo de carnes, fritos, dulces, es decir, con alta ingesta de carbohidratos simples, ácidos grasos saturados y trans y pobres en la ingesta de vegetales y ácidos grasos omega 3. Este patrón dietético ha sido relacionado con elevados niveles de moléculas proinflamatorias

en adultos (IL-6, TNF- α , PCR) (Giugliano *et al* 2006, Centritto *et al* 2009, Nanri *et al* 2011, Barbaresco *et al* 2013).

Se ha observado que una dieta mediterránea rica en polifenoles dietéticos (estudio MOLI-SANI) se asocia con marcadores inflamatorios en plasma, donde la PCR tiene un papel crucial (Bonaccio *et al* 2017). También se han relacionado los valores de PCR con patrones de dieta mediterránea, como los analizados en el estudio PREDIMED (Estruch 2010). En esta dieta es preciso destacar el elevado consumo de aceite de oliva virgen extra, alimentos de origen vegetal como verduras, frutas, cereales y frutos secos y pescados. Así, se ha documentado que este patrón dietético se asocia a una disminución del patrón inflamatorio merced al descenso de PCR (Estruch 2010, Casas *et al* 2014, Urpi-Sardá *et al* 2012, Bonaccio *et al* 2015, Bédard *et al* 2015).

Sin embargo, no tenemos conocimiento de estudios de patrones dietéticos y su relación con un estado inflamatorios en niños, por lo que serian de gran interés realizar más estudios nutricionales en una etapa temprana de la vida.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Las variaciones en el grado de obesidad a lo largo de la infancia podrían estar asociadas con cambios en los niveles de proteína C reactiva que contribuirían al establecimiento de un estado inflamatorio crónico de bajo grado a una edad infantil. A su vez, los niveles plasmáticos de PCR podrían estar determinados, además de por factores genéticos, por la dieta.

OBJETIVOS

1. Caracterizar los niveles de proteína C reactiva de alta sensibilidad (PCRas) en dos cohortes de niños españoles de 6 a 8 años de edad y en niños adolescentes de 12 a 16 años.

2. Analizar la relación de los valores de PCRas con la presencia de sobrepeso y obesidad, y con cambios en el grado de obesidad a lo largo de la infancia. Además de analizar la relación con las variables e indicadores antropométricos.

3. Evaluar la relación de los niveles de PCRas con el perfil lipídico, con las variables relacionadas con la resistencia a la insulina y con adipocinas tales como leptina y adiponectina de acuerdo al sexo y a la edad.

4. Estimar la prevalencia de polimorfismos comunes en el gen de la PCR (rs1205, rs1130864, rs2792145, rs1800947) tanto en la población general como en los niños categorizados por presencia o no de sobrepeso.

5. Estudiar la asociación de estos polimorfismos y de sus haplotipos con niveles de PCRas, variables antropométricas, variables lipídicas y con variables relacionadas con la resistencia a la insulina, en función del sexo y la edad.

6. Analizar la relación de los niveles de PCR con la dieta en niños de 6 a 8 años de edad.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE LA MUESTRA

1.1. Población

La población de nuestro estudio la constituyen aquellos niños del estudio Cuatro Provincias (4P) en los que se ha podido determinar los niveles de PCRas.

El estudio Cuatro Provincias se diseñó para analizar factores de riesgo cardiovascular en la población infantil de cuatro provincias españolas con distintas tasas de mortalidad coronaria en la edad adulta (Garcés y de Oya 2007). Para ello, en cada una de las provincias participantes (Madrid, Orense, Cádiz y Murcia), se obtuvieron muestras representativas de niños sanos entre 6 y 9 años en una primera cohorte, y de niños sanos entre 11 y 16 años en una segunda cohorte del estudio.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz. El conjunto de la investigación cumple las salvaguardias éticas de la Delegación de Helsinki, y sus posteriores actualizaciones, y la legislación española sobre investigación clínica en humanos.

1.2. Procedimiento de muestreo

Se trata de un estudio transversal, en el que los niños se seleccionaron mediante un muestreo aleatorio, estratificado y por conglomerados, en el que las unidades de análisis de referencia eran los centros públicos, concertados o privados de las provincias participantes. El muestreo tuvo dos etapas. En la primera, se seleccionaron los centros escolares, a partir de los datos de la Delegación Provincial de Educación que incluían el total de los colegios de cada provincia participante. En la segunda, se seleccionaron los alumnos.

En un primer corte del estudio, se estudiaron niños de edades comprendidas entre 6 y 8 años de los colegios seleccionados. Tras siete años, en un segundo corte, se volvieron a estudiar los niños incluidos en el primer corte del estudio que aceptaron participar, incorporando nuevos niños de edades similares y de los mismos colegios, hasta completar el tamaño muestral necesario para el estudio.

2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Los colaboradores de las distintas provincias (Prof. Ángel Gil en Madrid, Dr. Ovidio Fernández en Orense, Dr. Alipio Mangas y Dr. Alfonso Macías en Cádiz y Dr. Jacinto Fernández y Prof. Alberto Torres en Murcia) se encargaron de solicitar la autorización a la Delegación Provincial de Educación y al responsable del Área de Salud o equivalentes autonómicos. Una vez obtenido este permiso contactamos con las direcciones y asociaciones de padres de alumnos de los centros elegidos y se les explicó el sentido y finalidad del estudio. Recibida la autorización por parte del colegio realizamos una presentación oral ante los padres de los niños seleccionados como candidatos al estudio, donde les entregamos una carta informativa y una autorización que tenían que firmar para que sus hijos participaran en el mismo.

A los colegios se desplazaron cinco ATS para realizar las extracciones, y un equipo de campo entrenado en la toma de medidas físicas a los niños y que se encargaba asimismo de la manipulación y correcto almacenaje de las muestras de sangre hasta su llegada al laboratorio de referencia.

Para ser incluido en el estudio, cada niño tenía que acudir con la autorización firmada por el padre, madre o responsable legal. Asimismo, no se incluyeron en el estudio niños afectados de patología crónica, cuadros sindrómicos y/o que recibieran tratamiento médico crónico. También se descartaron aquellos niños y niñas diagnosticados de pubertad precoz.

La extracción se llevó a cabo a primera hora de la mañana y tras 12 horas de ayuno. A cada niño se le extraía, con material desechable, sangre por venopunción en dos tubos Venoject® (Terumo), uno vacío de 7 ml y otro de 3 ml conteniendo EDTA-K3 como anticoagulante. Desde el momento de la extracción hasta su traslado al laboratorio para su análisis, las muestras permanecieron en hielo.

Las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 3000 rpm y 4°C. Tras la centrifugación del tubo que contiene el anticoagulante, se obtenía, en la fracción inferior, las células que se trasvasaron a un tubo de vidrio reforzado que se congelaba a -70°C para posteriormente extraer el ADN. Se recogió la fracción superior (plasma) del tubo que contenía EDTA y la fracción superior (suero) del tubo sin EDTA. El plasma y el suero se alicuotaron para las determinaciones bioquímicas.

En las provincias de Orense, Cádiz y Murcia las muestras se centrifugaron inmediatamente después de la extracción y las células, el plasma y suero eran guardados en criotubos, congelándolas a -70°C hasta su transporte en nieve carbónica a nuestro laboratorio en Madrid.

Las muestras se almacenaron en el Biobanco del IIS Fundación Jiménez Díaz (RD90/0076/00101).

3. DETERMINACIONES ANTROPOMÉTRICAS

3.1. Obtención del peso, talla e IMC

El peso se midió hasta el último 0,1 kg con una balanza electrónica digital homologada y la talla se midió hasta el último milímetro con un estadiómetro portátil. Las medidas se realizaron con los niños vestidos con ropa ligera y sin

zapatos. Con estas medidas se calculó el IMC (índice de masa corporal) mediante la fórmula:

$$\text{IMC} = \text{peso (kg)} / \text{talla (m}^2\text{)}$$

El IMC Z-score se calculó de acuerdo a valores de referencia según el sexo y la edad en población infantil española (Carrascosa *et al* 2008). Nuestra población fue categorizada en función de su IMC, sexo y edad en niños con normopeso, con sobrepeso u obesidad de acuerdo a los puntos de corte propuestos por *Cole y colaboradores* en una síntesis de estudios internacionales y asumidos por el IOTF (*International Obesity Task Force*) (Cole *et al* 2000). Hemos considerado el término exceso de peso como el conjunto formado por los escolares con sobrepeso u obesidad.

3.2. Índices antropométricos

En los niños del segundo corte se recogió además información sobre índices antropométricos y masa corporal:

La circunferencia de la cintura (cm) se midió en la línea media entre el margen costal inferior y la cresta ilíaca a nivel de la espina ilíaca anteroposterior (con estimación de 0,5 cm).

La circunferencia de la cadera (cm) se determinó a nivel de los trocánteres mayores. A partir de ambas medidas se determinó la índice cintura/cadera. El Z-score de la circunferencia de la cintura se calculó de acuerdo a valores de referencia en función del sexo y de la edad en población infantil de referencia (Fernández *et al* 2004).

La grasa corporal se determinó mediante un analizador de la composición corporal (Tanita TBF-300M, Arlington Heights, IL) a través de la impedancia bioeléctrica que indica la resistencia intrínseca del cuerpo al paso de corriente

eléctrica. El músculo actúa como conductor de la corriente mientras que el tejido adiposo actúa como resistencia al paso de corriente.

El aparato es capaz de medir un porcentaje de grasa corporal entre el 1 y el 75%. Para que el aparato pueda realizar estas medidas hay que introducir previamente los datos de sexo, edad y talla del sujeto.

El peso de masa grasa corporal se determinó en Kg y se calculó el porcentaje.

4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS EN EL ESTUDIO 4P

4.1. Determinaciones lipídicas

El plasma recogido se utilizó para las siguientes determinaciones lipídicas:

- El colesterol total (CT) se valoró mediante técnica enzimática colesterol esterasa/colesterol oxidasa y posterior medición directa por absorción a 500 nm (Allain *et al* 1974).
- La concentración de colesterol-HDL (c-HDL) se determinó en el sobrenadante que resultó al precipitar, añadiendo al plasma ácido fosfotúngstico-cloruro de magnesio (Assmann *et al* 1983), las lipoproteínas que contienen Apo B y Apo E (LDL y VLDL) (Burstein *et al* 1970), del plasma total. Tras la precipitación, el c-HDL se determinó en el sobrenadante mediante la misma técnica enzimática que el CT.
- Los niveles de triglicéridos (TG) se determinaron mediante método enzimático lipasa/oxidasa (Menarini) (Bucolo y David 1973).
- El colesterol-LDL (c-LDL) se calculó mediante la fórmula de Friedewald (Friedewald *et al* 1972):

$$c\text{-LDL} = CT - TG/5 - c\text{-HDL}$$

Siempre que el valor de TG fuese inferior a 300 mg/dl.

- Los niveles de la apolipoproteína A1 (Apo-A1) y de la apolipoproteína B (Apo-B) se cuantificaron por métodos inmunoquímicos con anticuerpos específicos para la parte proteica de la molécula (Marcovina *et al* 1993).

Todas las determinaciones lipídicas se llevaron a cabo en un autoanalizador Array-1000. La variabilidad analítica se evaluó mediante un control comercial (Precinorm y Precipath de Roche). Los coeficientes de variación interensayo fueron de 1,4% para el colesterol, 1,7% para los TG, 5,5% para la Apo-A1 y de 4,8% para la Apo-B.

4.2. Determinaciones de insulina e índice HOMA-IR

La medición de la insulina se realizó mediante un ensayo inmunoradiométrico (IRMA) de dos lugares de unión (Bio-Rad). El IRMA es un ensayo no competitivo en el que el analito analizado se une a dos anticuerpos entre los que queda comprendido a modo de "sandwich". El primer anticuerpo monoclonal se encuentra fijado a la pared interna de los tubos. El otro anticuerpo también monoclonal se marca radiactivamente con yodo 125 (I125) para que pueda ser detectado. El analito presente en las muestras problema, los estándares y los controles se une a ambos anticuerpos formando un complejo tipo "sandwich". El reactivo que no se haya unido se elimina mediante decantación y lavado de los tubos. El I125 emite una radiación tipo gamma, la cantidad de esta radiación se cuantifica en un contador gamma y de este modo se obtiene la concentración de insulina que contiene el suero de cada individuo.

Una vez determinados los valores de glucosa e insulina calculamos el índice HOMA como marcador de resistencia a la insulina (Homeostasis Model Assesment of Insulin Resistance) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{HOMA-IR} = \text{insulina } (\mu\text{UI/ml}) \times \text{glucosa (mmol/L)} / 22.5$$

4.3. Determinación de los niveles de adipocinas

Los niveles de leptina se determinaron mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) tipo Sandwich (EIA-2395, DRG Instruments GmbH, Germany). Los pocillos de la placa están cubiertos de un anticuerpo monoclonal específico para la leptina. Tras añadir las muestras de suero se añade el anticuerpo secundario biotinilado, específico para un antígeno de la molécula de leptina. La biotina reacciona con un conjugado de estreptavidina peroxidasa que produce una reacción colorimétrica al reaccionar con el sustrato, proporcional a la concentración de hormona en la muestra. El rango de determinación está entre 0-100 ng/ml, los coeficientes de variación inter e intraensayo del kit eran menores del 8,6% y del 6,9% respectivamente y el límite de detección de 1 ng/ml.

Los niveles de adiponectina se determinaron con un kit comercial de ELISA tipo Sandwich (E09, Mediagnost GmbH, Reutlingen, Germany) mediante el empleo de dos anticuerpos de alta afinidad, en un primer paso la adiponectina se une al primer anticuerpo que recubre los pocillos y posteriormente se une a un anticuerpo biotinilado anti-adiponectina. La biotina reacciona con un conjugado de estreptavidina peroxidasa que produce una reacción colorimétrica al reaccionar con el sustrato, proporcional a la concentración de hormona en la muestra. El rango de determinación está entre 0-100 ng/ml, los coeficientes de variación inter e intraensayo del kit eran menores del 6,7% y del 4,7% respectivamente y el límite de detección de 0,6 ng/ml.

5. DETERMINACION DE NIVELES DE PROTEINA C REACTIVA

Los niveles de Proteína C reactiva de alta sensibilidad (PCRas) se determinaron con un kit comercial de ELISA tipo Sandwich (CRP High Sensitivity SK00080-02, Aviscera Bioscience, Inc., Santa Clara, USA). El rango de determinación es de 0,39 a 25 mg/l, los coeficientes de variación inter e intraensayo del kit eran menores del 12% y del 6% respectivamente y el límite de detección de 0,15 mg/l.

El protocolo comienza con una microplaca de 96 pocillos cubierta previamente con anticuerpos específicos para PCR. Los estándares, con concentraciones distintas de PCR recombinante humana y las muestras de plasma son pipeteadas en los pocillos, por lo que la PCR presente será inmovilizada en los pocillos. Después de lavar para deshechar cualquier proteína no específica que no esté unida, se añade un anticuerpo secundario biotinilado específico de PCR. Otro lavado eliminará cualquier anticuerpo biotinilado no unido. La biotina reacciona con un conjugado de estreptavidina-HRP que se añade a los pocillos. Después de lavar cualquier enzima no unida, se añade una solución de sustrato, lo que produce una reacción colorimétrica al reaccionar con la enzima, proporcional a la concentración de hormona en la muestra, la reacción de color azul es parada por otra solución cambiando a color amarillo, rápidamente la intensidad de color se mide en un lector de placas a una absorbancia de 450nm. La concentración de la proteína se calcula mediante una ecuación que nos facilita la curva de calibrado resultado de los estándares de concentración conocida utilizados en el ensayo, y se valida por el control positivo, de concentración conocida, proporcionado por el kit.

En la figura 1 observamos un esquema de como se produce la reacción colorimétrica del ELISA tipo sándwich, ya descrito previamente y en la figura 2 se muestra una fotografía de las placas de ELISA utilizadas en el ensayo donde se

observa la intensidad de color descendente de los estándares en las dos primeras filas de la placa, el resto representa las muestras de plasma de concentración desconocida.

Figura 1. Fundamento de la técnica ELISA tipo sandwich.

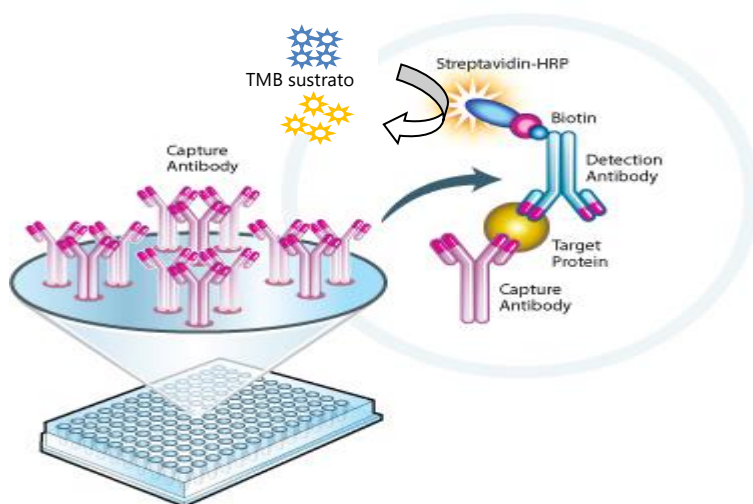
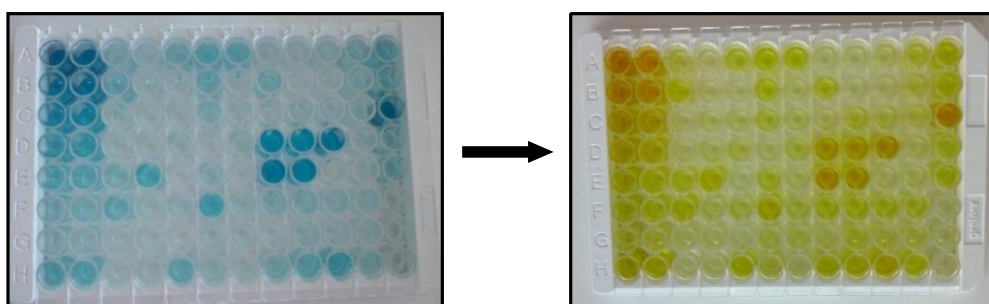


Figura 2. Placas proporcionadas por el kit donde observamos la reacción colorimétrica producida por el sustrato (azul) y al parar la reacción (amarillo).



6. DETERMINACIONES GENÉTICAS

6.1. Obtención y cuantificación del ADN

El ADN se obtuvo de glóbulos blancos de sangre periférica utilizando un tampón de fuerza iónica baja que rompe la pared celular por ósmosis, permitiendo la obtención de los núcleos y de éstos el material genético.

Los aproximadamente 3 ml de células que se obtuvieron después de separar el plasma de la muestra, se distribuyeron en tubos de polipropileno de 50 ml que se llenaron con tampón Montreal-Baltimore Express 1, se equilibraron con el mismo tampón, se taparon y se mezclaron.

Se centrifugaron en una centrífuga de alta velocidad Beckman Avanti J-25 (rotor JA-20), durante 15 minutos a 13000 rpm y a 4°C. Una vez terminada la centrifugación se decantaron, cuidando de no arrastrar el precipitado. Este precipitado se resuspendió en 4 ml de tampón Montreal 2, vertiendo los 4 ml en un homogeneizador, se homogeneizó la muestra hasta obtener una solución homogénea que se depositó otra vez en el tubo de 50 ml. Se añadieron 100 µl de dodecil sulfato sódico-sal disódica (SDS) 20 % (Genaxis), se mezcló y se incubó unos minutos en baño a 65°C, se añadieron 150 µl de proteinasa K 10 mg/ml (Promega), dejándolo incubar toda la noche en baño a 65°C con agitación.

Tras la digestión con SDS y proteinasa K se precipitaron las proteínas añadiendo al lisado de 4 ml, 1,5 ml de solución saturada de NaCl, agitando, equilibrando los tubos y centrifugando durante 15 minutos a 10000 rpm a temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante con una pipeta Pasteur y se transfirió a otro tubo de vidrio con tapón. En el nuevo tubo se precipitó el ADN añadiendo dos volúmenes de etanol absoluto 100% (Merck) frío por uno de sobrenadante, se invirtió con suavidad hasta que se visualizó la hebra de ADN. Se recogió el ADN con una pipeta Pasteur y se transfirió a un eppendorf con 500 µl

de Tris-EDTA (TE) 1X, se dejó disolver el ADN durante toda la noche en un agitador orbital antes de cuantificar.

La concentración de ADN se midió utilizando un espectrofotómetro Beckman DU 640B.

Los ácidos nucleicos absorben a 260 nm y las proteínas a 280 nm, y con la medida de estas dos absorbancias podemos calcular la concentración de ambos. Consideramos que un ADN está suficientemente purificado cuando la relación Abs260/Abs280 está entre 1,8 y 2.

Para calcular la concentración real de nuestra muestra, teníamos que multiplicar la concentración por el factor de dilución.

6.2. Determinación de los polimorfismos en los genes *PCR*, *LEP* y *LEPR*

Determinación de los polimorfismos del gen de la PCR:

El gen de la PCR está localizado en el cromosoma 1q23.2, tiene un tamaño de 1,9 Kb y contiene dos exones y un intrón. En este gen hemos analizado los siguientes polimorfismos:

-PCR 3'UTR G/A (rs1205): El SNP rs1205 se localiza en la región 3'UTR terminal en la posición +2147 y consiste en un cambio por sustitución de una guanina (G) por una adenina (A).

-PCR 3'UTR C/T (rs1130864): Polimorfismo en la posición +1444 de la región 3'UTR se debe a un cambio de una citosina (C) por una timina (T) por transición.

-PCR A-717G (rs2794521): Este polimorfismo se localiza en la zona promotora del gen en la posición -717 y se produce por sustitución de una adenina (A) por una guanina (G).

-PCR G1059C (rs1800947): En este polimorfismo implica un cambio de guanina a citosina en la posición +1059 localizada en el exón 2 del gen, es una mutación silenciosa y rara.

Estos polimorfismos se determinaron mediante la técnica PCR real time (RT-PCR) en un termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para ello empleamos ensayos de discriminación alélica comercializados por Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los ensayos de discriminación alélica Taqman® (Applied Biosystems), llevan dos sondas para la detección, en cada caso, del alelo 1 y el alelo 2 marcadas con los fluorocromos VIC® y FAM™ respectivamente.

Los ensayos de Applied Biosystems utilizados fueron el ID C_7479334_10, C_7479332_10, C_318207_10 y C_177490_10 para los SNPs de PCR rs1205, rs1130864, rs2794521 y rs1800947 respectivamente.

Determinación de los polimorfismos del gen de la leptina LEP y del gen del receptor de la leptina LEPR:

El gen de la leptina se localiza en el cromosoma 7q32.1, está formado por tres exones y dos intrones y se expande unas 18 kb. En nuestro estudio, hemos analizado el siguiente polimorfismo en niños prepuberales:

-LEP G-2548A (rs7799039): Este polimorfismo se localiza en la región promotora del gen de la leptina en la posición -2548 y consiste en un cambio de base de guanina (G) a adenina (A).

El gen del receptor de la leptina LEPR se localiza en el cromosoma 1p31.3 está formado por 20 exones y se expande unas 70 Kb. En este gen hemos analizado los siguientes polimorfismos:

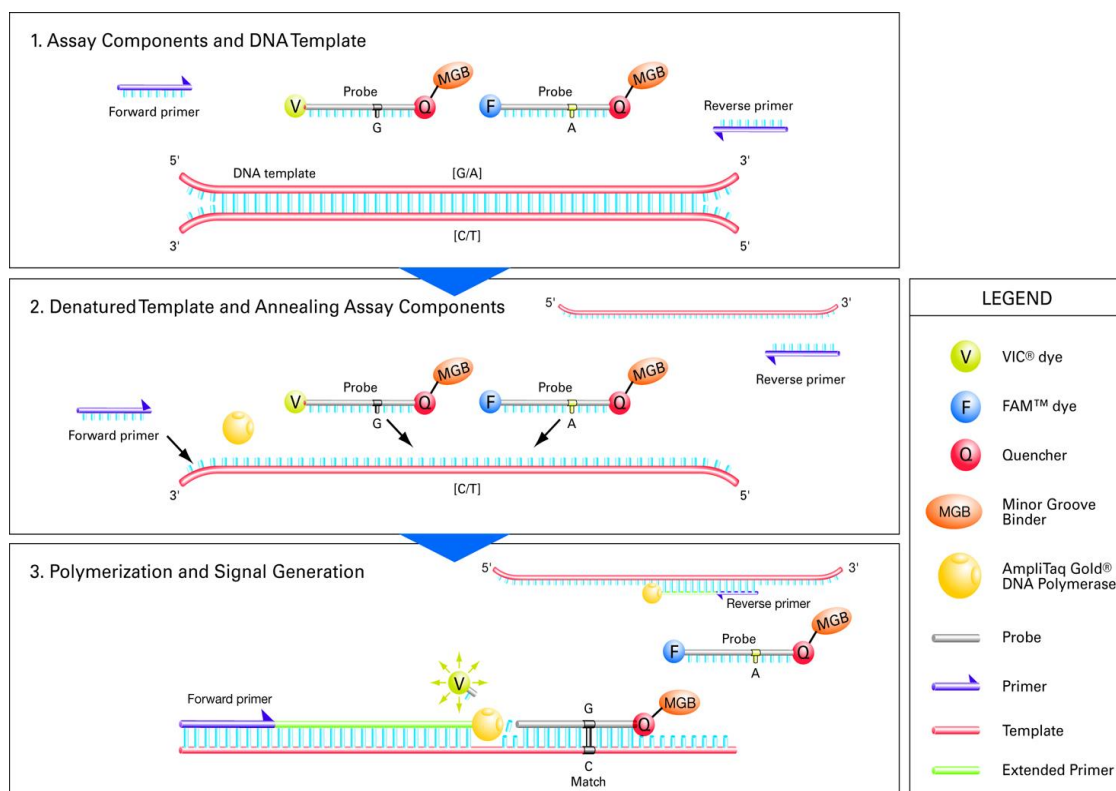
-LEPR Q223R (rs1137101): Este polimorfismo supone un cambio aminoacídico no conservativo de glutamina por arginina del codón 223 (CAG a CGG) en el exón 6 del gen.

-LEPR K109R (rs1137100): Polimorfismo que da lugar a un cambio aminoacídico de lisina por arginina en el codón 109 (AAG a AGG) en el exón 4.

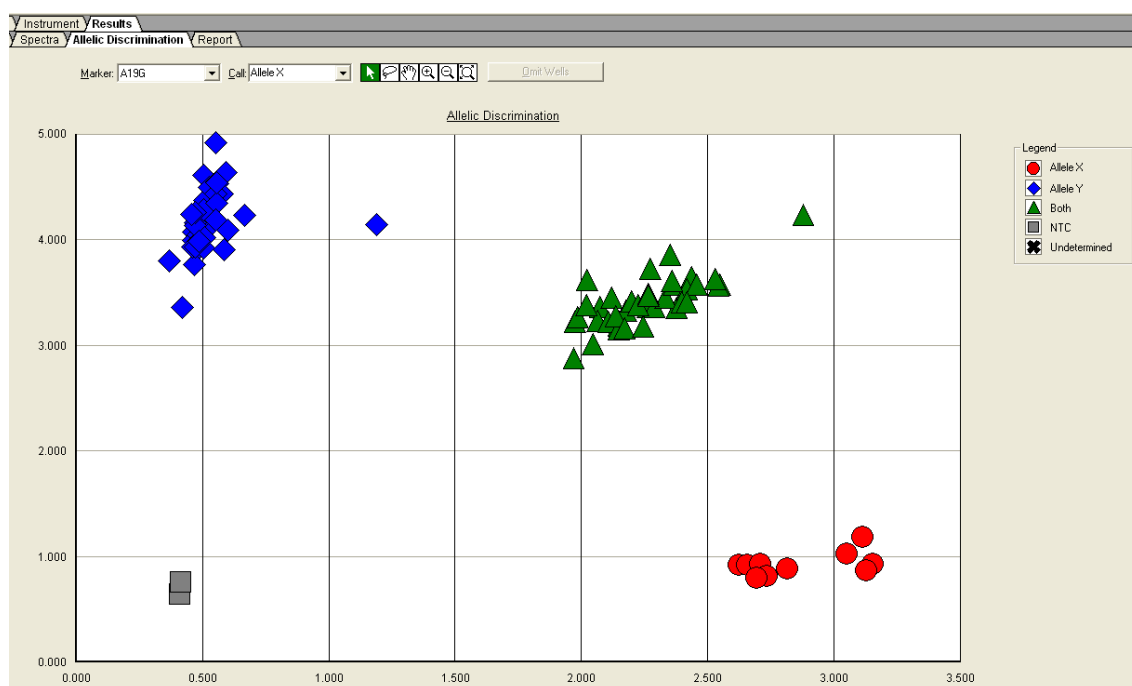
Para los SNPs LEP rs7799039 y LEPR rs1137100 y rs1137101 se utilizaron los ensayos, de Applied Biosystems, ID C_1328079_10, C_8722581_10 y C_518168_20 respectivamente.

En la figura 3 se esquematiza el protocolo de desarrollo de la discriminación alélica, donde la sonda marcada con VIC se une al alelo 1 y FAM se unen al alelo 2, y posterior amplificación que tiene lugar en la RT-PCR.

Figura 3. Esquema del protocolo de discriminación alélica y amplificación (Allelic Discrimination Getting Started Guide. Applied Biosystems).



Se emplearon 20ng de ADN ,900 nM de oligonucleótidos, 200 nM de las sondas y Taqman® Genotyping master mix (Applied Biosystems)2X. Las condiciones de amplificación fueron las recomendadas por ABI: 40 ciclos que comienzan en una desnaturalización a 95°C durante 10 min, hibridación a 92 °C durante 15 segundos. y posterior extensión a 60°C durante1 min. Los genotipos fueron asignados automáticamente tras la detección de la fluorescencia de cada muestra con el software específico (SDS 2.2.2 Allelic Discrimination Software v 1.4 (Applied Biosystems, Foster City, CA)) como se muestra en la figura 4.

Figura 4. Mapa de discriminación alélica.

Los rombos representan el genotipo homocigoto para el alelo X, los triángulos el genotipo heterocigoto y los círculos a los individuos homocigotos para el alelo Y. Los cuadros grises son los controles negativos (NTC).

7. INFORMACIÓN ALIMENTARIA Y NUTRICIONAL

La información nutricional la obtuvimos a través de un Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos (CFCA), que ha sido validado en España por el grupo de investigación dirigido por el Prof. José M^a Martín Moreno. Este cuestionario ha sido modificado y adaptado para la población infantil utilizando para dichos cambios las Guías de Alimentación Escolar y la Encuesta Nacional de Nutrición y Alimentación de España.

Este cuestionario nos interesa porque mide el consumo medio habitual de un determinado alimento o grupo de alimentos a lo largo de un año, lo que nos va a permitir obtener patrones de consumo de determinados alimentos en distintas poblaciones.

El CFCA está estructurado en torno a una lista de alimentos, a una porción estándar distinta para cada alimento y a una frecuencia de consumo.

La lista de alimentos está estructurada en los siguientes grupos: productos lácteos, huevos, carnes y pescados, verduras y hortalizas, legumbres y cereales, aceites y grasas, precocinados o preelaborados, bollería y pastelería, frutas, bebidas, y misceláneos, y finalmente se registra si el niño toma suplementos vitamínicos.

En cuanto a la frecuencia de consumo, esta puede ser: número de veces al día, número de veces a la semana, número de veces al mes, número de veces al año, nunca.

El mismo equipo de campo entrenado mediante sesiones demostrativas sobre cómo utilizar el CFCA, cumplimentó el cuestionario con la madre, padre o persona que acompañaba al niño en la población prepuberal de nuestro estudio y con el niño en la población puberal. El cuestionario se realizaba inmediatamente después de la extracción de sangre. Las encuestas fueron de 20-30 minutos para conseguir que las respuestas fueran lo más cercanas a la realidad y crearan un ambiente propicio entre encuestador y encuestado. Para la cumplimentación del CFCA tuvimos que tener en cuenta si el niño/a comía en el comedor escolar y si era así solicitábamos el menú de cada colegio para su posterior integración en el cuestionario.

Las mismas personas encargadas de realizar las encuestas fueron las encargadas de la introducción de los datos en un programa creado para este fin. El procesado de la información dietética se llevó a cabo mediante la conversión de los distintos alimentos en sus nutrientes usando la tabla de composición de alimentos de Moreiras *et al* (Moreiras-valera *et al* 1999) y para los casos en los que no existieran datos para alimentos concretos, se amplió con las tablas de alimentos españoles de Mataix *et al* (Mataix *et al* 1998).

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS versión 21.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Se realizó un análisis descriptivo de las variables, en el que se calcularon las medias y el intervalo de confianza al 95% (IC95%) en el caso de las variables cuantitativas y los porcentajes en el caso de las variables categóricas.

El contraste de las diferencias de lípidos y variables antropométricas entre sexos o entre niños obesos y no obesos se ha realizado mediante el test t de Student o U de Mann Whitney (test no paramétrico) en el caso de las variables cuantitativas y el test Chi cuadrado de Pearson en el caso del análisis de la prevalencia de obesidad y de las diferencias en la frecuencia de los polimorfismos por categorías de obesidad.

Las correlaciones entre variables antropométricas, hormonales y bioquímicas se determinaron mediante los coeficientes de correlación de Spearman para las variables no paramétricas o de Pearson para las paramétricas.

La normalidad de las variables se comprobó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y gráficas de distribución de frecuencias. Cuando la variable original no mostró una distribución se aplicó la transformación logarítmica, para conseguir la normalidad. Y en el caso que ésta no se alcanzara se aplicaron tests no paramétricos.

Las frecuencias de alelos y genotipos se determinaron mediante método de contaje. Todos los polimorfismos alcanzaron el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Los haplotipos se calcularon usando el programa R 3.3.0. Haplo.stats. Concretamente se ha utilizado la función haplo.glm perteneciente a la librería haplo. stats. Como las variables con las que se quieren relacionar los haplotipos son cuantitativas se han utilizado modelos glm gaussianos. Cada análisis muestra los haplotipos, los coeficientes para cada haplotipo, los intervalos de confianza

95% de los coeficientes y los valores de p. Tomando el haplotipo más frecuente como referencia, se compara los valores medios que presenta la respuesta en cada uno de ellos, con los valores medios que presenta la respuesta en el haplotipo de referencia.

Utilizamos ANOVA para comparar las variables bioquímicas, hormonales y antropométricas en función de la categoría de obesidad, así como para comparar dichas variables en función de los distintos genotipos de los polimorfismos estudiados en la población total y en niños y niñas por separado. Cuando encontramos diferencias significativas, utilizamos un test Post hoc Tukey para comparar cada par de grupos, siempre que las varianzas fueran homogéneas. En el caso de que las varianzas no fueran homogéneas, se utilizó un test post hoc Tamhane o Games-Howell.

Para determinar si los patrones dietéticos estaban asociados con los niveles de PCRas, se realizó un análisis factorial de componentes principales. Se utilizó una rotación Varimax para garantizar que se identificaron patrones dietéticos estandarizados, no correlacionados. Las puntuaciones de factor de regresión se utilizaron para los análisis de correlación parcial investigando la asociación entre patrones dietéticos y de PCRas.

9. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Una de las principales limitaciones en nuestro estudio es el elevado número de niños con valores de PCR por debajo del límite inferior de detección del ensayo, establecido en 0,15 mg/l, creando dificultades en el análisis estadístico.

Otra limitación importante es la falta de datos de desarrollo puberal que nos impide clasificar a los niños en función de su estadio de Tanner.

Y, por último, una limitación clave de nuestro estudio es la falta de información acerca de circunferencia de la cintura y de masa grasa en los niños prepuberales, que nos habría permitido examinar si estos parámetros se asocian con PCRas también a esta edad.

RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN

Los niveles de PCR se determinaron en 683 niños de edad prepuberal (6-8 años) y en 748 adolescentes (12-16 años). Un total de 272 niños participaron en ambas cohortes del estudio.

La información dietética estaba disponible en 571 niños de entre 6 y 8 años en los que habíamos analizado niveles de PCR.

El estudio genético pudo realizarse en un total de 1106 niños de 6-8 años de edad y en un total de 809 niños de 12 a 16 años de edad.

1.1. Características antropométricas de la población

La tabla 1 muestra los valores medios de las variables antropométricas en el grupo de niños entre 6 y 8 años de nuestro estudio. No se observan diferencias significativas entre sexos para ninguna de las variables estudiadas.

Tabla 1. Valores medios [media, (IC 95%)] de las variables antropométricas en niños de 6 a 8 años.

	TOTAL (n=683)	NIÑOS (n=326)	NIÑAS (n=357)
Edad (años)	6,7 (6,7-6,8)	6,7 (6,6-6,8)	6,7 (6,7-6,9)
Talla (m)	1,25 (1,25-1,26)	1,26 (1,25-1,26)	1,26 (1,24-1,26)
Peso (kg)	26,8 (26,5-27,1)	27,8 (26,4-27,4)	27,4 (26,2-27,2)
IMC	16,9 (16,8-17,1)	17,2 (16,7-17,1)	17,2 (16,8-17,2)
IMC-Zscore	0,03 (-0,03-0,09)	0,11 (-0,08-0,09)	0,14 (-0,03-0,14)

En la tabla 2 se muestran las características antropométricas de los adolescentes entre 12 y 16 años, y en la tabla 3 los datos sobre la composición corporal de aquéllos en los que fue posible recoger esta información. No se observan diferencias significativas de los valores del IMC entre sexos (tabla 2). La circunferencia del brazo, de la cintura, y el índice cintura/cadera son significativamente ($p<0,01$) mayores en los niños que en las niñas; sin embargo, la masa grasa corporal y el porcentaje de masa grasa son significativamente ($p<0,01$) más elevados en las niñas que en los niños, al contrario, ocurre con la masa magra que es mayor en niños ($p<0,01$) (tabla 3).

Tabla 2. Valores medios [media, (IC al 95%)] de las variables antropométricas en los niños de 12 a 16 años.

	TOTAL (n=748)	NIÑOS (n=347)	NIÑAS (n=401)
Edad (años)	13,9 (13,8-14,1)	13,9 (13,7-14,0)	13,9 (13,8-14,0)
Talla (m)	1,64 (1,63-1,64)	1,67 (1,66-1,68)	1,60 (1,60-1,61)
Peso (kg)	61,9 (60,4-63,3)	61,9 (64,6-69,3)	56,1 (55,6-58,5)
IMC	22,3 (21,9-22,7)	21,9 (21,9-23,3)	22,0 (21,5-22,5)
IMC Z-score	0,22 (0,11-0,33)	0,29 (0,11-0,47)	0,15 (0,01-0,28)

Tabla 3. Valores medios [media, (IC al 95%)] de composición corporal en los niños de 12 a 16 años.

	TOTAL (n=332)	NIÑOS (n=178)	NIÑAS (n=153)
Circ.brazo (cm)	24,5 (24,2-24,8)	25,1 (24,9-25,8)	24,4* (23,4-25,1)
Circ.cintura (cm)	78,3 (77,1-79,4)	77,4 (76,3-82,9)	72,9* (72,2-76,9)
Circ.cadera (cm)	93,5 (92,5-94,4)	92,9 (93,3-96,3)	93,6 (91,1-93,3)
Índice cintura/cadera	0,84 (0,83-0,84)	0,83 (0,81-0,86)	0,78* (0,71-0,83)
Masa grasa (kg)	14,6 (13,7-15,5)	12,6 (11,1-14,0)	16,7* (15,6-17,6)
Masa grasa (%)	22,7 (21,7-23,7)	17,2 (15,9-18,5)	28,2* (26,9-29,0)
Masa magra (kg)	47,2 (46,2-48,2)	54,4 (53,1-55,7)	40,4* (39,7-41,0)

*p<0,01 U Mann Whitney test

En la tabla 4 se muestra la prevalencia de normopeso, sobrepeso y obesidad en nuestra población clasificada de acuerdo a los puntos de corte propuestos por *The International Obesity Task Force* (IOTF) para población infantil (Cole *et al* 2000). En el grupo de 12 a 16 años la prevalencia de sobrepeso y obesidad es significativamente ($p=0,008$) superior en los niños que en las niñas; sin embargo, en el grupo de 6 a 8 años no hay diferencias significativas entre los dos grupos.

Tabla 4. Prevalencia de niños en función de la categoría de obesidad en % (n).

	6-8 años			12-16 años		
	NIÑOS (n=249)	NIÑAS (n=280)	p	NIÑOS (n=348)	NIÑAS (n=401)	p
Normopeso	71,9% (179)	66,8% (187)	NS	65,2% (227)	75,3% (302)	0,008
Sobrepeso	16,1 % (40)	20% (56)		26,7% (93)	20,0% (80)	
Obeso	12,0% (30)	13,2% (37)		8,1% (28)	4,7% (19)	

 χ^2 test, $p<0,05$

2. NIVELES DE PCRas EN LA POBLACIÓN

Los niveles medios de PCRas en cada grupo de edad y sexo se muestran en la tabla 5. Los niveles medios de PCRas no presentan diferencias significativas entre niños y niñas en ninguno de los grupos de edad.

Tabla 5. Niveles medios (mg/l) de PCRas [media, (IC al 95%)] en función del sexo.

	TOTAL	NIÑOS	NIÑAS
6-8 años (n=684)	0,94 (0,82-1,01)	0,89 (0,72-1,05)	0,98 (0,81-1,16)
12-16 años (n=751)	0,74 (0,65-0,82)	0,81 (0,68-0,93)	0,67 (0,56-0,78)

Los niveles de PCRas se encuentran por debajo del límite de detección (0,15 mg/l) en un número elevado de niños. En la tabla 6 se muestran los porcentajes de niños con niveles de PCRas por debajo de este límite de detección. Observamos que un 40,1% de niños y un 35% de niñas de edad prepuberal se encuentran por debajo del límite de detección y en adolescentes un 31,4% y un 33,9% en niños y niñas respectivamente. No encontramos asociación significativa en ningún grupo de edad.

Tabla 6. Porcentaje (%; (n)) de niños y niñas de edad prepuberal y adolescentes en función del límite de detección.

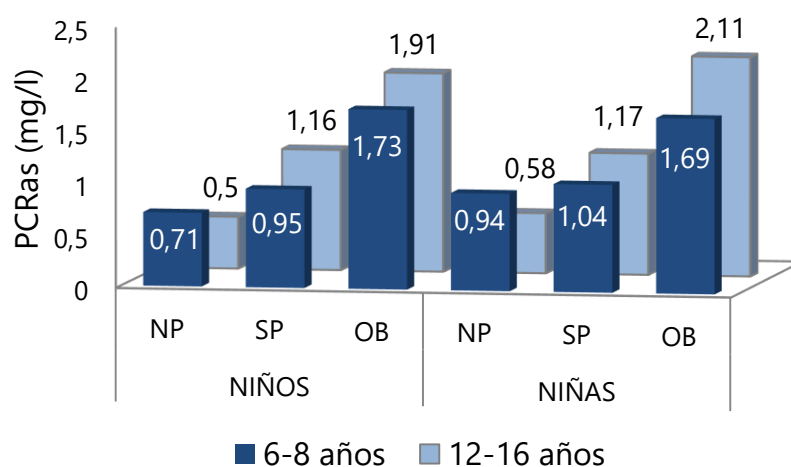
		6-8 años			12-16 años		
		NIÑOS	NIÑAS	p	NIÑOS	NIÑAS	p
PCR (mg/l)	≤0,15	40,1% (131)	35% (125)	NS	31,4% (110)	33,9% (136)	NS
	>0,15	59,9% (196)	65% (232)		68,6% (240)	66,1% (265)	

3. NIVELES DE PCRas Y VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS

3.1. Niveles de PCRas por categoría de obesidad

En la figura 1 se muestran los niveles plasmáticos de PCRas en función de la categoría de obesidad. Observamos que los niveles de PCR aumentan gradualmente y significativamente con la categoría de obesidad en niños y niñas de 12-16 años. Los niños y niñas prepuberiles que presentan obesidad muestran los niveles de PCR significativamente más altos que los niños con normopeso o sobrepeso.

Figura 1. Niveles plasmáticos de PCRas (mg/l) en niños prepuberiles y adolescentes en función de la categoría de obesidad.



	6-8 años (n=683)				12-16 años (n=748)			
	NP (69%)	SP (18%)	OB (13%)	p*	NP (71%)	SP (23%)	OB (6%)	p*
NIÑOS	0,71±1,3	0,95±1,7	1,73±2,2	<0,001	0,50±0,7	1,16±1,4	1,91±1,7	<0,001
NIÑAS	0,94±1,8	1,04±1,4	1,69±2,0	<0,001	0,58±1,0	1,17±2,0	2,11±2,0	<0,001

Media±desviación estándar NP: normopeso; SP: sobrepeso; OB: obeso *p: Kruskal-Wallis test

En la tabla 7 se muestran los porcentajes de los niños con normopeso y exceso de peso (sobrepeso y obesidad) con valores mayores o menores del límite de detección del ensayo. Observándose que existen diferencias significativas a ambas edades con mayor porcentaje de niños con exceso de peso por encima del límite de detección.

Tabla 7. Porcentaje [% (n)] de niños con niveles mayores o menores del límite de detección en función de la categoría de obesidad.

	6-8 años			12-16 años		
	≤0,15 mg/l	>0,15 mg/l	p	≤0,15 mg/l	>0,15 mg/l	p
NP %	43,9% (165)	56,1% (201)	<0,001	31,7% (212)	68,3% (317)	<0,05
SP+OB %	15,8% (32)	84,2% (131)		11,3% (33)	88,8% (184)	

χ^2 test NP: normopeso SP: sobrepeso OB: obeso

3.2. Relación de los niveles de PCRas con las variables e índices antropométricos y con la composición corporal

Al evaluar la relación de los niveles medios de PCRas (mg/l) con las variables antropométricas peso, IMC y IMC-Z score mediante un análisis de correlación de Spearman (tabla 8), observamos que existen correlaciones significativas y positivas en ambos sexos y grupos de edad.

Tabla 8. *Análisis de correlación de Spearman entre niveles de PCRas (mg/l) y variables antropométricas en ambas cohortes.*

	6-8 años		12-16 años	
	NIÑOS (n=260)	NIÑAS (n=291)	NIÑOS (n=349)	NIÑAS (n=401)
Peso	,187**	,186**	,271**	,158**
IMC	,183**	,280**	,395**	,211**
IMC-Zscore	,184**	,278**	,410**	,219**

**p<0,01

Al analizar los índices antropométricos (circ. de la cintura, de la cadera, índice cintura/cadera) y la composición corporal (masa grasa) en adolescentes, encontramos correlaciones significativas y positivas con todos estos parámetros en ambos sexos (tabla 9).

Tabla 9. *Análisis de correlación de Spearman de los niveles de PCRas (mg/l) con los índices antropométricos y con la composición corporal con 12 a 16 años.*

	NIÑOS (n=146)	NIÑAS (n=153)
Circ. de cintura (cm)	,391**	,237**
Circ. cadera (cm)	,303**	,146**
Índice cintura/cadera	,234**	,123*
Masa grasa (kg)	,504**	,229**
Masa grasa (%)	,377**	,182*

*p<0,05 **p<0,01

3.3. Niveles de PCRas y cambios de categoría de obesidad

Para analizar la relación entre cambios de categoría de obesidad a la edad prepuberal y en la adolescencia y niveles de PCRas, hemos clasificado los niños en cuatro grupos:

1.NP-NP: niños prepuberales con normopeso que continúan con normopeso en la adolescencia.

2.NP-SP: niños prepuberales con normopeso que presentan exceso de peso en la adolescencia.

3.SP-NP: niños con exceso de peso a los 6-8 años que presenta normopeso en la adolescencia.

4.SP-SP: niños con exceso de peso en ambos grupos de edad.

En la tabla 10 podemos observar que los niveles de PCRas fueron significativamente más elevados en los niños del grupo SP-SP que los niños del grupo NP-NP. Los niveles más bajos de PCRas se observan en niños que pasan de presentar SP a la edad prepuberal a presentar NP a la edad puberal (SP-NP). Estas diferencias no fueron significativas en las niñas, aunque las tendencias son similares.

Tabla 10. Relación de los niveles de PCRas con los cambios de categoría de obesidad entre niños de edad prepuberal (6-8 años) y adolescentes (12-16 años).

	TOTAL (302)			NIÑOS (136)			NIÑAS (166)		
	n	Media (IC 95%)	p	n	Media (IC 95%)	p	n	Media (IC 95%)	p
1. NP-NP	184	0,65 (0,50-0,82)		84	0,85 (0,40-0,76)		100	0,65 (0,39-0,91)	
2. NP-SP	29	1,09 (0,55-1,62)	1-4* 3-4*	17	1,21 (0,38-2,03)	1-4* 3-4*	12	0,89 (0,05-1,74)	NS
3. SP-NP	42	0,52 (0,36-0,69)		12	0,47 (0,18-0,76)		30	0,54 (0,29-0,80)	
4. SP-SP	47	1,39 (0,87-1,92)		23	1,63 (0,96-2,31)		24	1,34 (0,34-2,33)	

ANOVA Games Howell post hoc *p<0,05

NP: normopeso; SP: sobrepeso y obeso

4. RELACIÓN DE LOS NIVELES DE PCRas CON VARIABLES BIOQUÍMICAS

4.1. Asociación de los niveles de PCRas con el perfil lipídico

Para investigar la asociación de niveles de PCRas con el perfil lipídico, hemos comparado niveles de las variables lipídicas por terciles de PCR en niños prepuberales y adolescentes. Observamos que en niños y niñas prepuberales (tabla 11) los niveles de c-HDL y Apo AI disminuyen progresivamente entre el tercil 1 y 3 de PCR, con diferente significación entre los terciles 1 y 3 en ambos sexos. En adolescentes (tabla 12) se observa estas mismas diferencias en niños y la misma tendencia en niñas, aunque no es significativa.

Tabla 11. Perfil lipídico (mg/dl) por terciles de PCRas en niños de 6-8 años.

6-8 años Niños (n=326)				
	1: $\leq 0,15$ mg/l	2: 0,16-0,53mg/l	3: $\geq 0,54$ mg/l	P
TC	186,5 \pm 25,8	183,1 \pm 33,1	181,5 \pm 22,8	NS
TG	66,1 \pm 18,5	74,8 \pm 38,7	72,9 \pm 26,2	NS
c-HDL	62,9 \pm 12,2	58,5 \pm 12,9	55,9 \pm 13,3	<0,001 1-2*1-3**
APO AI	140,9 \pm 17,1	135,3 \pm 19,1	130,6 \pm 17,8	<0,001 1-3**
c-LDL	110,4 \pm 24,9	109,6 \pm 33,8	110,9 \pm 21,8	NS
APOB	69,9 \pm 131	70,9 \pm 16,6	69,9 \pm 13,5	NS
6-8 años Niñas (n=357)				
	1: $\leq 0,15$ mg/l	2: 0,16-0,63mg/l	3: $\geq 0,64$ mg/l	P
TC	183,7 \pm 28,6	182,1 \pm 29,5	184,5 \pm 29,6	NS
TG	68,4 \pm 23,9	72,8 \pm 25,8	76,1 \pm 21,6	NS
c-HDL	61,2 \pm 11,8	59,2 \pm 13,1	55,0 \pm 14,8	<0,01 1-3*
APO AI	136,6 \pm 17,8	134,3 \pm 16,7	129,8 \pm 19,0	<0,05 1-3*
c-LDL	108,8 \pm 26,6	108,4 \pm 26,8	114,3 \pm 27,1	NS
APOB	72,7 \pm 2,3	69,1 \pm 2,2	73,4 \pm 2,0	NS

ANOVA, tukey o Games-Howell post hoc según se requiera *p<0,05 **p<0,01

Tabla 12. Perfil lipídico (mg/dl) por terciles de PCRas en niños de 12-16 años.

	12-16 años Niños (n=350)			
	1: $\leq 0,17$ mg/l	2: 0,18-0,63mg/l	3: $\geq 0,64$ mg/l	P
TC	161,6 \pm 27,3	160,9 \pm 28,1	163,8 \pm 26,9	NS
TG	76,1 \pm 35,4	75,9 \pm 30,8	84,5 \pm 39,3	NS
c-HDL	53,7 \pm 14,7	50,8 \pm 15,9	46,8 \pm 11,6	<0,01 1-3*
APO-AI	148,2 \pm 21,6	149,5 \pm 30,9	137,8 \pm 24,1	<0,01 1-3*
c-LDL	92,8 \pm 24,9	94,8 \pm 24,4	100,2 \pm 24,3	NS
APOB	67,8 \pm 15,9	68,2 \pm 14,7	73,5 \pm 16,2	NS
	12-16 años Niñas (n=398)			
	1: $\leq 0,15$ mg/l	2: 0,16-0,46mg/l	3: $\geq 0,47$ mg/l	P
TC	172,3 \pm 32,2	172,5 \pm 27,4	169,2 \pm 28,0	NS
TG	72,6 \pm 21,0	75,0 \pm 27,4	78,4 \pm 32,8	NS
c-HDL	55,8 \pm 13,6	55,7 \pm 14,3	53,5 \pm 14,9	NS
APO-AI	149,2 \pm 24,6	151,9 \pm 25,7	145,1 \pm 23,8	0,083
c-LDL	101,8 \pm 29,0	101,6 \pm 27,5	100,0 \pm 24,9	NS
APOB	71,4 \pm 18,2	69,6 \pm 15,3	71,7 \pm 14,7	NS

ANOVA, tukey o Games-Howell post hoc según se requiera *p<0,05 **p<0,01

En un análisis de correlación de Spearman observamos que los niveles de PCRas, en los niños prepuberales de 6-8 años, muestran una asociación negativa y significativa con c-HDL y ApoAI en ambos sexos y positiva con triglicéridos y c-LDL solo en niñas. En los niños de 12 a 16 años solo encontramos una correlación significativa y negativa de los niveles de PCRas con c-HDL y ApoAI y positiva con ApoB y c-LDL solo en niños (tabla 13).

Tabla 13. Correlaciones de Spearman de la PCR (mg/l) con las variables lipídicas.

	6-8 años		12-16 años	
	NIÑOS (n=326)	NIÑAS (n=357)	NIÑOS (n=349)	NIÑAS (n=400)
TG (mg/dl)	,079	,192**	,083	,062
CT (mg/dl)	-,064	,035	,009	-,040
c-HDL (mg/dl)	-,254**	-,259**	-,198**	-,052
ApoAI (mg/dl)	-,251**	-,188**	-,189**	-,088
c-LDL (mg/dl)	,042	,118*	,117*	-,015
ApoB (mg/dl)	,023	,072	,108*	,028

*p<0.05 **p<0.01

4.2. Asociación de los niveles de PCRas con las variables relacionadas con la resistencia a la insulina

En la tabla 14 se muestran los niveles de glucosa, insulina y HOMA por terciles de PCR, observándose que tanto la insulina como el HOMA muestran diferencias significativas entre el tercil 1 y 3 en niñas de 6 a 8 años. En adolescentes no se observan estas diferencias significativas (tabla 15).

Tabla 14. Glucosa (mg/dl), insulina (μ UI/ml) y HOMA en niños prepuberales por terciles de PCRas.

	6-8 años Niños (n=326)			
	1: $\leq 0,15$ mg/l	2: 0,16-0,53mg/l	3: $\geq 0,54$ mg/l	P
Glucosa	88,9 \pm 9,5	88,7 \pm 8,5	90,1 \pm 9,3	NS
Insulina	3,4 \pm 1,9	3,6 \pm 2,8	4,2 \pm 2,7	NS
HOMA	0,8 \pm 0,4	0,8 \pm 0,7	0,9 \pm 0,6	NS
	6-8 años Niñas (n=357)			
	1: $\leq 0,15$ mg/l	2: 0,16-0,63mg/l	3: $\geq 0,64$ mg/l	P
Glucosa	88,3 \pm 8,5	88,7 \pm 8,6	88,8 \pm 9,8	NS
Insulina	3,2 \pm 2,1	4,0 \pm 3,4	4,2 \pm 3,1	<0,05 1-3*
HOMA	0,7 \pm 0,5	0,9 \pm 0,7	0,9 \pm 0,7	<0,05 1-3*

ANOVA, tukey o Games-Howell post hoc según se requiera *p<0,05

Tabla 15. Glucosa (mg/dl), insulina (μ UI/ml) y HOMA por terciles de PCRas en niños de 12-16 años.

	12-16 años Niños (n=350)			
	1: $\leq 0,17$ mg/l	2: 0,18-0,63mg/l	3: $\geq 0,64$ mg/l	p
Glucosa	92,4 \pm 7,8	95,2 \pm 24,4	91,8 \pm 10,1	NS
Insulina	7,9 \pm 3,9	10,2 \pm 11,0	8,8 \pm 4,9	NS
HOMA	1,8 \pm 0,4	2,6 \pm 3,5	1,9 \pm 1,2	NS
	12-16 años Niñas (n=398)			
	1: $\leq 0,15$ mg/l	2: 0,16-0,46mg/l	3: $\geq 0,47$ mg/l	p
Glucosa	90,3 \pm 8,9	88,1 \pm 8,9	88,7 \pm 8,4	NS
Insulina	8,2 \pm 4,3	8,9 \pm 4,8	8,6 \pm 5,2	NS
HOMA	1,9 \pm 1,6	1,8 \pm 0,9	1,9 \pm 1,4	NS

En la tabla 16 se muestran las correlaciones entre los niveles de PCR y glucosa, insulina y HOMA. Se observan correlaciones significativas y positivas entre niveles de PCR con insulina y con HOMA en niñas prepuberales.

Tabla 16. Correlaciones de Spearman de la PCR (mg/l) con variables relacionadas con la resistencia a la insulina.

	6-8 años		12-16 años	
	NIÑOS (n=326)	NIÑAS (n=356)	NIÑOS (n=350)	NIÑAS (n=399)
Glucosa (mg/dl)	,014	-,014	-,019	-,066
Insulina (μUI/ml)	,076	,138*	,043	,019
HOMA	,065	,134*	,041	,000

*p<0,05

4.3. Relación de los niveles de PCRas con adipocinas

Se ha analizado asimismo la posible asociación de la PCR con leptina y adiponectina. En la tabla 17 y 18 observamos que la leptina muestra diferencias

significativas entre los terciles 1 y 3 de valores de PCRas tanto en niños como en niñas prepuberales y adolescentes, acentuándose en los niños de 12 a 16 años. Por el contrario, la adiponectina no presenta diferencias significativas en ninguna de las dos cohortes de edad considerando los mismos terciles de valores de PCRas.

Tabla 17. Niveles de leptina (ng/ml) y adiponectina (μg/ml) en niños prepuberales por terciles de PCRas.

	6-8 años Niños (n=326)			
	1: ≤0,15 mg/l	2: 0,16-0,53mg/l	3: ≥0,54 mg/l	P
Leptina	3,7±4,5	5,2±5,7	9,5±10,1	<0,001 1-3**
Adiponectina	18,9±12,1	21,1±12,5	20,5±11,8	NS
	6-8 años Niñas (n=357)			
	1: ≤0,15 mg/l	2: 0,16-0,63mg/l	3: ≥0,64 mg/l	P
Leptina	6,8±7,9	9,5±8,6	12,4±12,1	<0,01 1-3*
Adiponectina	17,5±8,6	16,5±11,3	17,5±8,6	NS

ANOVA, tukey o Games-Howell post hoc según se requiera *p<0,05 **p<0,01

Tabla 18. Niveles de leptina (ng/ml) y adiponectina (μg/ml) en niños adolescentes por terciles de PCRas.

	12-16 años Niños (n=350)			
	1: ≤0,17 mg/l	2: 0,18-0,63mg/l	3: ≥0,64 mg/l	p
Leptina	3,3±4,6	6,1±7,9	10,1±9,9	<0,001 1-2**1-3**2-3*
Adiponectina	11,6±6,9	10,8±6,6	10,6±6,3	NS
	12-16 años Niñas (n=398)			
	1: ≤0,15 mg/l	2: 0,16-0,46mg/l	3: ≥0,47 mg/l	p
Leptina	14,2±7,8	16,5±10,0	19,2±12,1	<0,05 1-3*
Adiponectina	15,7±8,6	15,2±7,7	14,5±7,2	NS

ANOVA, tukey o Games-Howell post hoc según se requiera *p<0,05 **p<0,01

En la tabla 19, al evaluar la relación de los niveles medios de PCRas (mg/l) con los niveles de leptina y adiponectina mediante un análisis de correlación de Spearman, observamos que existe una correlación significativa y positiva con la leptina en ambos sexos y grupos de edad. La adiponectina no muestra asociación significativa.

Tabla 19. *Correlaciones de Spearman de la PCR (mg/l) con leptina y adiponectina.*

	6-8 años		12-16 años	
	NIÑOS (n=199)	NIÑAS (n=203)	NIÑOS (n=350)	NIÑAS (n=401)
Leptina (ng/ml)	,267**	,207**	,363**	,163**
Adiponectina (µg/ml)	,055	,230	-,066	-,069

**p<0,01

5. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNPs) EN EL GEN DE PCR

En las dos cohortes de nuestro estudio (niños y adolescentes) hemos analizado cuatro polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) en el gen de la *PCR* que son altamente prevalentes en otras poblaciones donde se han estudiado previamente (Brull *et al* 2003). Estos SNPs son el rs1205 y rs1130864 en la región 3'UTR, rs2794521 en la región promotora y rs1800947 en la región exónica del gen.

5.1. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs de *PCR*

Se estudiaron cuatro polimorfismos (SNPs) del gen *PCR*: rs1205, rs1130864, rs2794521 y rs1800947. En el caso del SNP rs1205 se genotiparon un total de 1078 niños, para el SNP rs1130864 fueron 1082, para rs2794521 se genotiparon 1106 niños y para el SNP rs1800947 fueron 1101 niños de entre 6 y 8 años. En los niños de 12 a 16 años se genotiparon 809 niños para los SNPs rs1205 y rs1130864 y 795 para los SNPs rs2794521 y rs1800947.

La prevalencia para el alelo menos común (A) de rs1205 fue 32,5%, para el alelo T de rs1130864 fue 34,8%, la prevalencia para el alelo G de rs2794521 fue de 24,4%. Y, por último, la prevalencia del SNP rs1800947 para el alelo C fue 5,7%.

En la tabla 20 se pueden observar más detalladamente las frecuencias genotípicas y alélicas para los cuatro SNPs descritos.

Tabla 20. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de PCR en las dos cohortes de nuestro estudio.

SNPs	6-8 años			12-16 años		
	n	Alelos %	Genotipos %(n)	n	Alelos %	Genotipos %(n)
rs1205	1078	G: 67,8	GG: 45,3(478)	809	G: 67,2	GG: 45,2(366)
		A: 32,2	GA: 44,9(484)		A: 32,8	GA: 44,0(356)
			AA: 9,8(106)			AA: 10,8(87)
rs1130864	1082	C: 65,2	CC: 43,9 (475)	809	C: 65,3	CC: 40,9(331)
		T: 34,8	CT: 44,5(482)		T: 34,7	CT: 48,7(394)
			TT: 11,6(125)			TT: 10,4(84)
rs2794521	1106	A: 75,4	AA: 57,2(633)	795	A: 75,9	AA: 57,7(459)
		G: 24,6	AG: 36,4(403)		G: 24,1	AG: 36,4(289)
			GG: 6,4(70)			GG: 5,9(47)
rs1800947	1101	G: 94,2	GG: 86,4(951)	795	G: 94,3	GG: 88,9(707)
		C: 5,8	GC: 13,5(149)		C: 5,7	GC: 10,7(85)
			CC: 0,1(1)			CC: 0,4(3)

SNP: single nucleotide polymorphism.

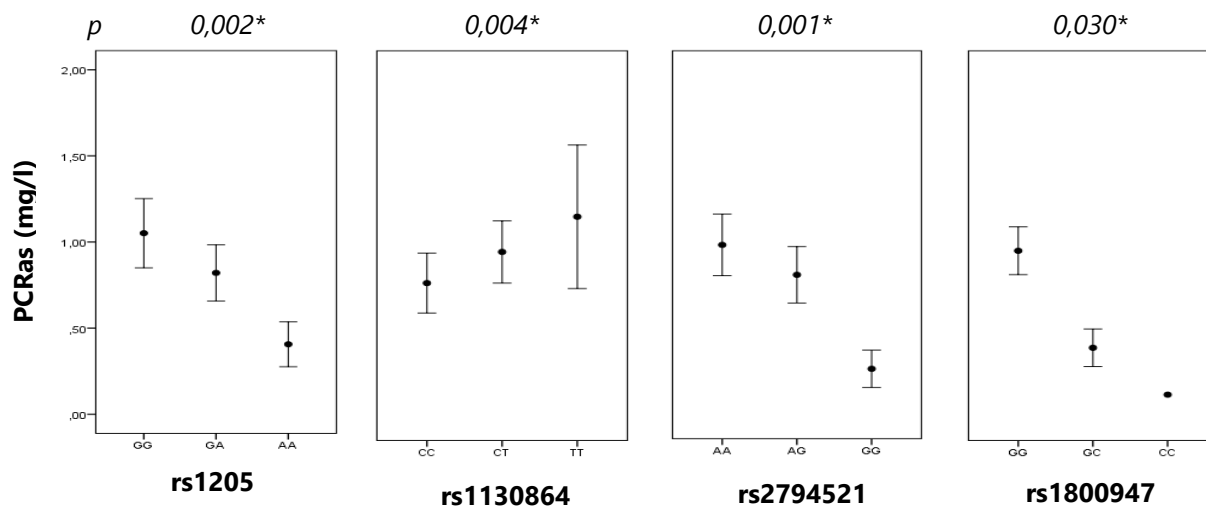
5.2. Relación de los SNPs de *PCR* con los niveles de PCRs

Las figuras 2 y 3 muestran los niveles de PCRs (mg/l) para niños y adolescentes respectivamente, según los genotipos para los cuatro SNPs del gen de *PCR* estudiados.

El eje x muestra el genotipo para cada SNP en orden homocigoto para el alelo mayoritario, heterocigoto y homocigoto para el alelo minoritario. Se observan diferencias significativas entre los niveles de PCRs y los cuatro SNPs de *PCR* en ambas cohortes de edad. De manera que solo el SNP rs1130864 presenta niveles de PCRs mayores para los genotipos que presentan el alelo minoritario; mientras que en los otros SNPs los niveles de *PCR* para los genotipos que presentan el alelo minoritario son los más bajos.

Figura 2. Asociación entre polimorfismos de PCR y niveles de PCRas (las barras corresponden al 95% IC de la media) en niños prepuberales.

6 - 8 años



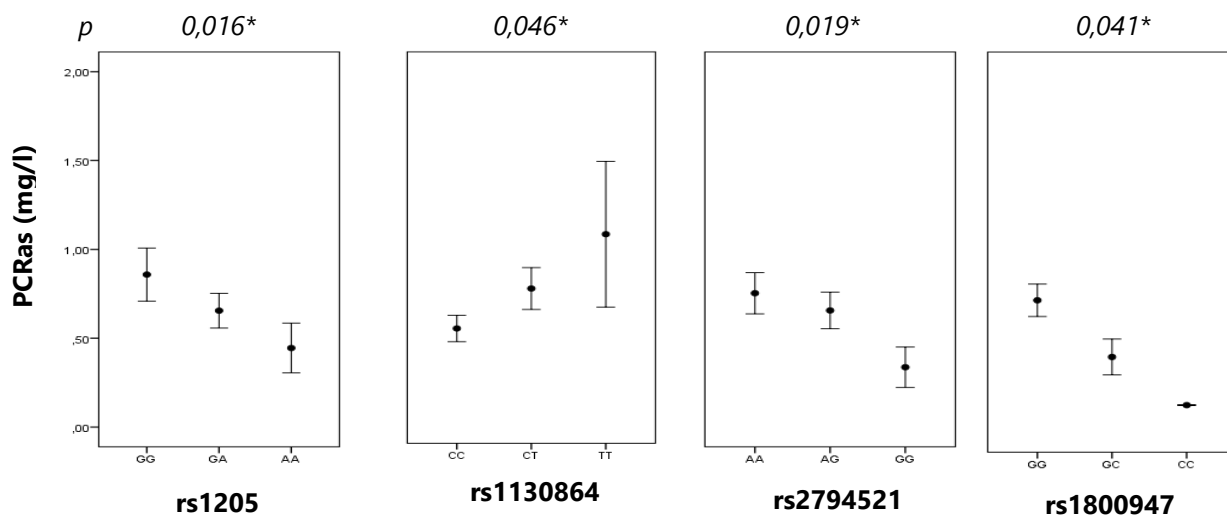
PCRas (media±DE)

rs1205	n=638	rs1130864	n=662	rs2794521	n=637	rs1800947	n=638
GG(299)	1,05±1,76	CC(269)	0,79±1,42	AA(375)	0,99±1,74	GG(561)	0,97±1,64
GA(279)	0,82±1,38	CT(347)	0,96±1,57	AG(226)	0,83±1,23	GC(76)+	0,42±0,47
AA(60)	0,45±0,60	TT(75)	1,16±1,95	GG(36)	0,29±0,33	CC(1)	

* Kruskal Wallis test y U Mann Whitney cuando se requiera.

Figure 3. Asociación entre polimorfismos de PCR y niveles de PCRas (las barras corresponden al 95% IC de la media) en adolescentes.

12 - 16 años



PCRas (media±DE)							
rs1205	n=713	rs1130864	n=710	rs2794521	n=698	rs1800947	n=692
GG(326)	0,86±1,37	CC(288)	0,52±0,65	AA(405)	0,75±1,18	GG(623)	0,73±1,15
GA(311)	0,66±0,87	CT(347)	0,76±1,12	AG(254)	0,66±0,83	GC(67)+	0,37±0,35
AA(76)	0,44±0,61	TT(75)	1,07±1,80	GG(39)	0,34±0,37	CC(2)	

*Kruskal Wallis test y U Mann Whitney cuando se requiera.

En la tabla 21 se observan las distintas combinaciones de haplotipos de los SNPs de PCR en orden: rs1205, rs1130864, rs1800947 y rs2794521. Los coeficientes representan diferencias entre niveles de PCR en medias geométricas al comparar con el haplotipo de referencia. Observamos que dos haplotipos frecuentes, ACGA y GCGG, se asocian consistentemente en ambas cohortes con un descenso de los niveles de PCR. Esta asociación se muestra significativa después de ajustar por IMC, sexo y edad. En los niños de 6-8 años el haplotipo ACCA también se asocia de forma significativa con los niveles de PCR, y en niños de 12-16 años ocurre lo mismo que con el haplotipo ATGA.

Tabla 21. Asociación de haplotipos de PCR con niveles de PCRs en niños y adolescentes.

		Análisis sin ajustar		Análisis ajustado ^c	
Haplotipo ^a		Coef. (95% CI) ^b	p	Coef. (95% CI) ^b	p
6-8 años					
PCR	GTGA	Referencia			
(n=490)	ACCA	-0,43 (-0,74, -0,11)	0,009	-0,42 (-0,74, -0,11)	0,009
	ACGA	-0,25 (-0,45, -0,05)	0,014	-0,24 (-0,44, -0,05)	0,016
	GCGA	-0,04 (-0,30, 0,21)	0,753	-0,06 (-0,32, 0,20)	0,660
	GCGG	-0,33 (-0,52, -0,14)	0,001	-0,33 (-0,52, -0,14)	0,001
12-16 años					
PCR	GTGA	Referencia			
(n=685)	ACCA	-0,10 (-0,35, 0,15)	0,443	-0,09 (-0,35, 0,16)	0,471
	ACGA	-0,19 (-0,33, -0,04)	0,013	-0,18 (-0,33, -0,03)	0,016
	ATGA	-0,64 (-1,16, -0,12)	0,016	-0,65 (-1,17, -0,13)	0,014
	GCGA	0,01 (-0,19, 0,20)	0,927	0,01 (-0,18, 0,21)	0,900
	GCGG	-0,18 (-0,33, -0,03)	0,016	-0,18 (-0,33, -0,03)	0,016

^a Haplotipos en orden: rs1205, rs1130864, rs1800947 y rs2794521.

^b Coeficiente (95% CI) y p fueron calculados por la función haplo.glm del programa Haplo.stats.

^c Análisis ajustado por sexo, edad y IMC.

5.3. Relación de los SNPs de PCR con las variables antropométricas

En las tablas 22 y 23 se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas de los cuatro SNP de PCR en los niños con normopeso y en los que tienen exceso de peso (niños con sobrepeso u obesidad) a las edades de 6 a 8 años y de 12 a 16 años respectivamente. En ningún caso se observan diferencias significativas en las frecuencias genotípicas o alélicas en niños con normopeso respecto a niños con sobrepeso.

Tabla 22. Frecuencias genotípicas [% (n)] y alélicas (%) de los SNPs de PCR en los niños con normopeso o con exceso de peso de 6 a 8 años.

rs1205	Normopeso	Exceso de peso
GG	46,4% (287)	43,9% (102)
GA	43,8% (271)	46,6% (108)
AA	9,8% (61)	9,5% (22)
G	68,3%	67,2%
A	31,7%	32,8%
rs1130864	Normopeso	Exceso de peso
CC	46,5% (291)	39,7% (93)
CT	42,6% (266)	46,6% (109)
TT	10,9% (68)	13,7% (32)
C	67,8%	63,0%
T	32,2%	37,0%
rs2794521	Normopeso	Exceso de peso
AA	45,8% (238)	58,3% (117)
AG	45,9% (239)	37,9% (105)
GG	8,3% (43)	3,8% (19)
A	67,7%	77,2%
G	31,3%	22,8%
rs1800947	Normopeso	Exceso de peso
GG	85,9% (550)	85,7% (203)
GC	13,9%(89)	14,3% (34)
CC	0,2% (1)	-
G	92,9%	92,8%
C	7,1%	7,2%

 χ^2 test

Tabla 23. Frecuencias genotípicas [% (n)] y alélicas (%) del SNP de PCR en los niños con normopeso o con exceso de peso de 12 a 16 años.

rs1205	Normopeso	Exceso de peso
GG	45,3% (264)	45,7% (102)
GA	43,9% (256)	44,4% (99)
AA	10,8% (63)	9,9% (22)
G	67,2%	67,9%
A	32,8%	32,1%
rs1130864	Normopeso	Exceso de peso
CC	40,6% (235)	40,4% (90)
CT	48,2% (279)	51,1% (114)
TT	11,2% (65)	8,5% (19)
C	64,7%	65,9%
T	35,3%	34,1%
rs2794521	Normopeso	Exceso de peso
AA	59,3% (338)	55,3% (120)
AG	35,6% (203)	38,2% (83)
GG	5,1% (29)	6,5% (14)
A	77,1%	74,4%
G	22,9%	25,6%
rs1800947	Normopeso	Exceso de peso
GG	88,9% (505)	92,6% (200)
GC	10,7% (61)	7,4% (16)
CC	0,4% (2)	-
G	89,7%	96,3%
C	10,3%	3,7%

 χ^2 test

Al analizar la asociación de los SNPs de PCR con las variables antropométricas comparando las medias del IMC e IMC-Zscore en función del genotipo de los SNPs de PCR en niños prepuberales y adolescentes respectivamente (tabla 24) tampoco se observan diferencias significativas entre estas medidas en ninguno de los casos.

En los adolescentes de 12 a 16 años en los que disponemos de información sobre las medidas de la circunferencia de la cintura y de la composición corporal, tampoco se ha encontrado asociación de los SNPs con ninguno de estos parámetros.

Tabla 24. Valores medios (IC al 95%) de los índices antropométricos para cada genotipo de los SNPs en los niños de 6 a 8 años y 12 a 16 años.

	6-8 años			12-16 años	
	IMC	IMC Z-score		IMC	IMC Z-score
rs1205					
GG (389)	16,9 (16,6-17,3)	0,03 (0,01-0,18)	GG (365)	21,7(21,3-22,0)	0,13 (-0,07-0,20)
GA (380)	16,9 (16,6-17,3)	0,02 (0,1-0,15)	GA (356)	21,9 (21,5-22,3)	0,17 (-0,13-0,15)
AA (83)	16,7 (16,1-17,6)	-0,01 (-0,30-0,28)	AA (85)	21,9 (21,1-22,8)	0,20 (-0,02-0,42)
rs1130864					
CC (385)	16,7 (16,5-17,1)	-0,03 (-0,16-0,10)	CC (325)	21,8 (21,4-22,3)	0,17 (0,05-0,29)
CT (375)	17,1 (16,7-17,4)	0,03(-0,11-0,20)	CT (394)	21,7 (21,4-22,1)	0,14 (0,04-0,23)
TT (100)	17,5 (16,7-18,4)	0,24 (-0,10-0,57)	TT (83)	21,8 (20,9-22,7)	0,15 (-0,08-0,38)
rs2794521					
AA (495)	17,1 (16,7-17,4)	0,05 (-0,10-0,17)	AA (458)	16,9 (16,6-17,3)	0,14 (0,05-0,24)
AG (329)	16,8 (16,5-17,3)	-0,01 (-0,20-0,15)	AG (286)	16,8 (16,5-17,1)	0,18(0,06-0,31)
GG (52)	16,5 (15,6-16,9)	-0,19 (-0,5-0,08)	GG (43)	16,9 (15,8-17,9)	-0,09(-0,37-0,2)
rs1800947					
GG (754)	16,9 (16,7-17,2)	0,03 (-0,1-0,13)	GG (705)	21,7 (16,6-17,1)	0,15 (0,07-0,22)
GC (123)	17,0 (16,1-17,4)	-0,06 (-0,32-0,2)	GC (75)	21,6 (16,5-18,2)	0,08 (-0,16-0,32)
CC (1)	14,4	-0,9	CC (2)	20,6 (6,1-35,0)	0,14(-3,19-2,91)

ANOVA

5.4. Relación de los SNPs de PCR con el perfil lipídico

En la tabla 25 y 26 se muestra los niveles de las variables del perfil lipídico, para los cuatro polimorfismos de PCR estudiados en niños prepuberales y adolescentes. El perfil lipídico no mostró asociaciones significativas con los genotipos de PCR para ningún grupo de edad analizado.

Tabla 25. Valores medios de las variables lipídicas en función del genotipo de cada SNP en los niños de 6 a 8 años.

	TG	CT	C-HDL	Apo-A1	L-LDL	Apo-B
rs1205						
GG (479)	74,2±28,5	181,6±26,1	59,1±14,2	135,9±19,3	107,7±25,9	69,9±14,3
GA (480)	72,2±24,2	184,2±28,5	59,8±12,2	137,3±18,7	110,2±26,5	71,1±15,3
AA (106)	68,1±19,9	186,5±36,1	60,7±13,6	138,3±19,7	112,2±34,4	70,8±16,7
rs1130864						
CC (470)	71,2±22,1	183,5±29,1	60,2±12,5	137,8±18,3	109,2±27,5	70,2±14,9
CT (477)	72,1±23,6	182,8±28,3	59,1±13,9	135,9±19,2	109,3±27,1	70,3±14,9
TT (128)	78,4±38,7	184,9±26,0	58,8±13,7	137,2±20,8	110,4±26,2	72,2±15,1
rs2794521						
AA(632)	72,3±27,4	183,6±28,7	59,7±13,2	137,3±19,2	109,4±28,2	70,7±15,5
AG(399)	72,8±22,6	183,3±27,5	59,4±13,5	136,8±19,0	109,3±25,1	70,5±14,3
GG(62)	71,4±22,9	176,4±21,4	60,1±12,5	135,9±16,3	102,6±22,8	66,8±12,0
rs1800947						
GG(946)	72,1±25,7	182,5±28,2	59,6±13,6	136,9±19,4	108,5±26,9	70,1±14,9
GC(145)	73,6±23,1	186,4±26,7	59,2±11,1	137,6±16,5	112,5±25,9	72,2±14,3
CC(1)	80,0	217,7	46,0	128	155,7	101,0

Media±DE ANOVA

Tabla 26. Valores medios de las variables lipídicas en función del genotipo de cada SNP en los niños de 12 a 16 años.

	TG	CT	C-HDL	Apo-A1	L-LDL	Apo-B
rs1205						
GG (361)	78,1±31,6	164,5±27,3	52,3±13,9	144,5±25,1	96,6±25,2	69,2±14,3
GA (354)	77,5±32,4	169,2±29,4	52,6±14,9	147,5±25,8	101,0±26,5	71,4±17,4
AA (86)	76,4±28,5	164,1±32,3	52,7±15,8	145,8±21,4	95,9±27,5	68,3±16,8
rs1130864						
CC (322)	76,2±31,1	166,5±29,8	53,2±14,9	146,2±23,2	98,1±26,8	70,2±16,7
CT (392)	78,0±31,4	166,1±29,0	51,9±14,4	146,2±27,3	98,4±25,4	70,3±14,9
TT (84)	85,1±36,3	170,3±26,6	52,2±12,9	147,0±22,9	100,9±26,6	69,6±15,5
rs2794521						
AA(458)	78,7±33,3	165,9±28,8	52,4±14,8	146,6±25,5	97,7±25,5	69,7±16,3
AG(282)	76,7±30,6	168,6±30,4	53,2±14,4	147,2±26,3	99,9±28,1	70,9±16,6
GG(42)	75,5±27,2	160,5±17,5	50,4±10,1	139,4±20,4	95,1±17,8	68,6±10,8
rs1800947						
GG(700)	78,2±32,5	166,4±29,1	52,4±14,4	146,1±26,1	98,3±26,2	69,9±16,3
GC(75)	74,6±27,4	168,2±27,7	53,4±15,8	148,9±21,6	99,9±25,7	71,7±15,4
CC(2)	57,5±10,8	167,6±27,8	52,8±16,2	137,9±22,5	103,4±13,7	75,9±7,5

Media±DE ANOVA

5.5. Relación de los SNPs de *PCR* con las variables relacionadas con la resistencia a la insulina

En las tablas 27 y 28 se muestran los niveles de las variables relacionadas con el metabolismo hidrocarbonado para los cuatro SNPs estudiados. Observamos que la insulina y el HOMA mostraron diferencias significativas para el SNP rs1800947 en niños y adolescentes, siendo estos niveles mayores para los genotipos GC+CC. Los niveles de glucosa también mostraron diferencias significativas para este SNP en adolescentes.

Tabla 27. Valores medios de las variables relacionadas con la resistencia a insulina en función del genotipo de cada SNP en los niños de 6 a 8 años.

	GLUCOSA	INSULINA	HOMA
rs1205			
GG (398)	90,4±11,9	3,6±2,6	0,81±0,59
GA (409)	90,2±9,2	3,6±2,9	0,81±0,72
AA (90)	89,8±7,9	3,6±2,3	0,81±0,54
rs1130864			
CC (470)	90,5±12,3	3,7±2,9	0,82±0,71
CT (477)	89,3±8,4	3,5±2,4	0,78±0,56
TT (128)	90,9±8,1	3,9±3,2	0,87±3,2
rs2794521			
AA(632)	90,5±11,5	3,6±2,9	0,79±0,69
AG(399)	90,0±8,4	3,5±2,5	0,79±0,56
GG(62)	91,0±9,4	3,8±2,1	0,86±0,46
rs1800947			
GG (946)	90,3±10,6	3,6±2,7	0,80±0,64
GC(145)+CC(1)	90,7±8,2	3,3±2,3*	0,74±0,55*

Media±DE ANOVA o T-test *p<0,05

Tabla 28. Valores medios de las variables relacionadas con la resistencia a insulina en función del genotipo de cada SNP en los niños de 12 a 16 años.

	GLUCOSA	INSULINA	HOMA
rs1205			
GG (360)	90,4±9,4	8,7±6,8	1,93±1,53
GA (354)	91,4±15,8	8,5±5,1	1,96±1,74
AA (85)	90,5±9,2	9,3±6,6	2,11±1,94
rs1130864			
CC (321)	90,8±16,4	8,9±6,4	2,04±2,04
CT (393)	90,9±9,6	8,5±6,2	1,91±1,44
TT (84)	91,3±7,9	8,4±4,1	1,89±0,93
rs2794521			
AA (632)	90,9±9,3	8,5±5,8	1,91±1,34
AG (399)	91,5±17,2	8,9±6,3	2,08±2,14
GG (62)	87,2±10,5	8,8±7,8	1,83±0,46
rs1800947			
GG (706)	90,5±9,0	8,5±5,9	1,89±1,34
GC(76)+CC(1)	94,8±28,2**	10,1±7,6*	2,54±3,47**

Media±DE ANOVA o T-test *p< 0.05 **p<0.01

5.6. Relación de SNPs de *LEP* y *LEPR* con los niveles de PCR

Se ha estudiado la posible asociación de polimorfismos en otros loci, el SNP en el gen de la leptina (rs7799039) y dos SNPs en el gen del receptor de la leptina (rs1137101 y rs1137100) con niveles de PCR. De esta manera, hemos observado asociaciones significativas de estos SNPs con niveles de PCRas. En el SNP rs7799039 de *LEP*, los niveles son más bajos para el genotipo AA a ambas edades. Y para los SNPs rs1137101 y rs1137100, en el gen *LEPR*, los niveles son más alevados para el genotipo GG a ambas edades (tabla 29).

Tabla 29. Niveles de PCR según genotipos de *LEP* y *LEPR* en niños prepuberales.

6-8 años		12-16 años	
LEP genotipos		rs7799039 (G2548A)	
GG (195)	1,10±1,91	GG (235)	0,81±1,23
GA (321)	0,89±1,47	GA (346)	0,69±1,04
AA (124)	0,55±0,78	AA (126)	0,51±0,54
p: GG-AA*		p: GG-AA*	
LEPR genotipos		rs1137101 (Q223R)	
AA (221)	0,68±0,94	AA (184)	0,35±0,29
AG (319)	0,89±1,58	AG (302)	0,44±0,47
GG (103)	1,54±2,43	GG (134)	0,75±1,22
p: AA-GG* AG-GG*		p: AA-GG**	
LEPR Genotipos		rs1137100 (K109R)	
AA (364)	0,72±0,99	AA (388)	0,70±0,99
AG (241)	0,96±1,76	AG (287)	0,65±0,95
GG (41)	2,57±3,23	GG (29)	1,27±1,80
p: AA-GG* AG-GG*		p: AA-GG** AG-GG**	

Media±DE U Mann-Whitney test *p<0,05 **<0,01

5.7. Relación de los SNPs de PCR con los niveles de leptina

Al analizar la relación de SNPs de la PCR con leptina, se observan asociaciones significativas para el polimorfismo rs2794521 en el gen de la PCR, entre los genotipos AA y GG en ambos grupos de edad y entre AG y GG en adolescentes, siendo menores los niveles de leptina para GG tanto en niños de 6-8 años como en niños de 12-16 años (tabla 30).

Tabla 30. Niveles de leptina según genotipos de PCR en niños prepuberales y adolescentes.

6-8 años			12-16 años		
PCR genotipos	Leptina (ng/ml)	p	Leptina (ng/ml)	P	
rs1205					
GG (181)	3,39±3,65	NS	GG (358)	10,72±10,02	NS
GA (195)	3,94±4,45		GA (353)	11,30±10,42	
AA (46)	4,39±3,98		AA (85)	13,29±11,44	
rs1130864					
CC (176)	3,64±3,80	NS	CC (321)	12,47±11,51	NS
CT (200)	3,78±3,84		CT (390)	10,70±9,80	
TT (57)	4,08±5,46		TT (82)	9,63±9,32	
rs2794521					
AA (265)	3,81±4,19	AA-GG*	AA (454)	10,88±9,98	AG-GG*
AG (141)	3,83±3,98		AG (282)	12,15±10,83	AA-GG*
GG (17)	2,06±1,95		GG (41)	9,20±11,84	
rs1800947					
GG (363)	3,88±4,27	NS	GG (696)	11,09±10,19	NS
GC (61)	2,98±2,77		GC (73)	12,66±12,11	
CC (0)	-		CC (2)	12,94±11,76	

Media±DE U Mann Whitney test *p<0.05

6. RELACIÓN DE LOS NIVELES DE PCR CON LA INGESTA DIETÉTICA

En niños y niñas prepuberales de 6 a 8 años hemos analizado la relación de los niveles de PCR con la ingesta de nutrientes y principios inmediatos de la dieta.

La información sobre la dieta fué recogida en un total de 571 niños, 301 niñas y 270 niños, con una media de edad de 6,7 años, de los que disponemos de un informe sobre la frecuencia de consumo de alimentos (consumo de cada nutriente en g/día para alimentos sólidos y cm³/día para líquidos).

6.1. Características de la dieta en niños y niñas de la población de estudio

En la tabla 31 se muestran las características antropométricas, y la ingesta de nutrientes de la dieta en niños y niñas prepuberales. Se observan diferencias significativas entre sexos en la energía total (Kcal) y el porcentaje de ácidos grasos saturados, siendo mayor en niños, mientras que el porcentaje de hidratos de carbono complejos es mayor en niñas. Las otras variables no presentaron diferencias significativas entre sexos.

Tabla 31. Medidas antropométricas e ingesta de nutrientes diaria en niños de edad prepuberal en función del sexo.

	NIÑAS (n=301)	NIÑOS (n=270)
Edad (años)	6,7±0,7	6,7±0,6
Peso (kg)	27,4±5,9	27,5±5,6
Altura (m)	1,26±0,07	1,27±0,06
IMC	17,2±2,7	17,2±2,6
IMC Z-score	0,01±0,96	0,05±0,98
Energía (Kcal)	2090±497	2186±518*
Proteínas (%)	17,2±2,4	17,3±2,5
Ácidos grasos totales (%)	45,7±4,5	46,4±4,6
Ácidos grasos saturados (%)	16,4±2,7	17,2±2,8**
Ácidos grasos monoinsaturados (%)	18,4±2,7	18,3±2,6
Ácidos grasos poliinsaturados (%)	8,3±1,8	8,2±1,9
Hidratos de carbono (%)	38,4±5,8	37,8±6,0
Hidratos de carbono complejos (%)	18,0±4,5	17,3±4,1*
Hidratos de carbono simples (%)	21,1±5,6	21,3±6,1
Fibra (g)	19,6±7,2	19,9±7,6

T-test o U Mann-Whitney test según se requiera.

*p<0.05 **p<0.01

6.2. Ingesta diaria de nutrientes según terciles de PCR en niños y niñas

Para evaluar la relación de los niveles de PCR con la dieta hemos analizado la ingesta energética total y la ingesta de nutrientes según terciles de PCR ajustando por IMC. Se observa que las niñas que corresponden al tercil más alto de PCR (tercil 3), la ingesta de ácidos grasos saturados es significativamente mayor, mientras que la ingesta de fibra, vitamina E e IAS es significativamente más baja, en comparación con los terciles 1 y 2 de PCR. En niños no se observan estas diferencias significativas.

Tabla 32. Ingesta de nutrientes diaria e IAS (media±SD) según terciles de PCRas en niños prepuberales en función del sexo.

	NIÑAS				NIÑOS			
	Tercil 1 (≤0,15)	Tercil 2 (0,16-0,61)	Tercil 3 (≥0,62)	P	Tercil 1 (≤0,15)	Tercil 2 (0,16-0,47)	Tercil 3 (≥0,48)	P
Energía (Kcal)	2083±446	2104±531	2021±492	NS	2162±542	2173±510	2223±539	NS
Proteínas (%)	16,9±2,5	17,3±2,7	17,3±2,5	NS	16,9±2,7	17,1±2,3	17,5±2,4	NS
Ácidos grasos totales (%)	45,3±4,8	46,3±4,2	45,7±4,3	NS	46,0±4,3	46,7±4,5	45,6±4,3	NS
Ácidos grasos saturados (%)	15,7±2,7	16,6±2,3	17,1±3,0	1-3**	17,3±2,8	17,0±2,7	16,9±2,7	NS
Ácidos grasos monoinsaturados (%)	17,9±2,5	18,5±2,8	18,7±2,9	NS	18,1±2,4	18,5±2,5	18,0±2,4	NS
Ácidos grasos poliinsaturados (%)	8,5±1,9	8,5±1,8	8,1±1,8	NS	8,1±1,8	8,5±2,1	7,9±1,8	NS
Hidratos de carbono (%)	39,3±6,1	37,7±5,3	38,4±5,8	NS	38,4±5,9	37,5±5,6	38,6±5,7	NS
Hidratos de carbono simples (%)	21,6±5,1	20,8±5,9	21,3±6,5	NS	21,9±6,1	21,1±5,4	21,7±5,8	NS
Hidratos de carbono complejos (%)	18,1±4,5	17,8±5,1	17,7±3,9	NS	17,4±3,9	17,5±4,6	17,5±4,1	NS
Fibra (g)	20,8±7,3	19,3±7,7	18,0±6,3	1-3**	19,9±7,4	19,5±6,2	20,1±6,5	NS
Vitamina A (µg)	646±169	659±170	616±206	NS	706±207	693±191	700±212	NS
Vitamina E (mg)	10,8±3,5	10,9±4,3	9,8±4,2	1-3* 2-3*	10,8±4,7	10,9±3,7	10,6±3,9	NS
IAS	66,1±8,9	64,7±8,5	62,8±10,3	1-3*	63,4±8,6	64,3±7,6	65,4±7,9	NS

IAS: Índice de Alimentación Saludable, NS: no significativo.

*p < 0,05 **p < 0,01 ANOVA ajustado por IMC, Tukey o Games-Howell post hoc test según se requiera.

6.3. Consumo de alimentos según terciles de PCR en niños y niñas

De forma paralela a lo que ocurre con la ingesta de fibra y IAS (tabla 32), en la figura 4 se observa, igualmente, un descenso significativo en la ingesta de frutas, vegetales, legumbres y de alimentos específicos como es la mermelada, en función del tercil de PCR.

a) Las niñas en el tercil más alto de PCRs mostraron ingestas significativamente menores de vegetales que aquellas en el tercil 1 ó 2 (155 g/día en el tercil 3 frente a 181 g/día en los terciles 1-2, $p<0,05$).

b) Las niñas en el tercil más alto de PCRs mostraron ingestas significativamente menores de fruta (173 g/día) que aquellas en el tercil 2 (194 g/día) y en el tercil 1 (210 g/día) ($p<0,05$).

c) La ingesta de fibra en el tercil más alto de PCR fue significativamente la más baja (17,9 g/día en el tercil 3 frente a 20,8 g/día en el tercil 1, $p<0,01$).

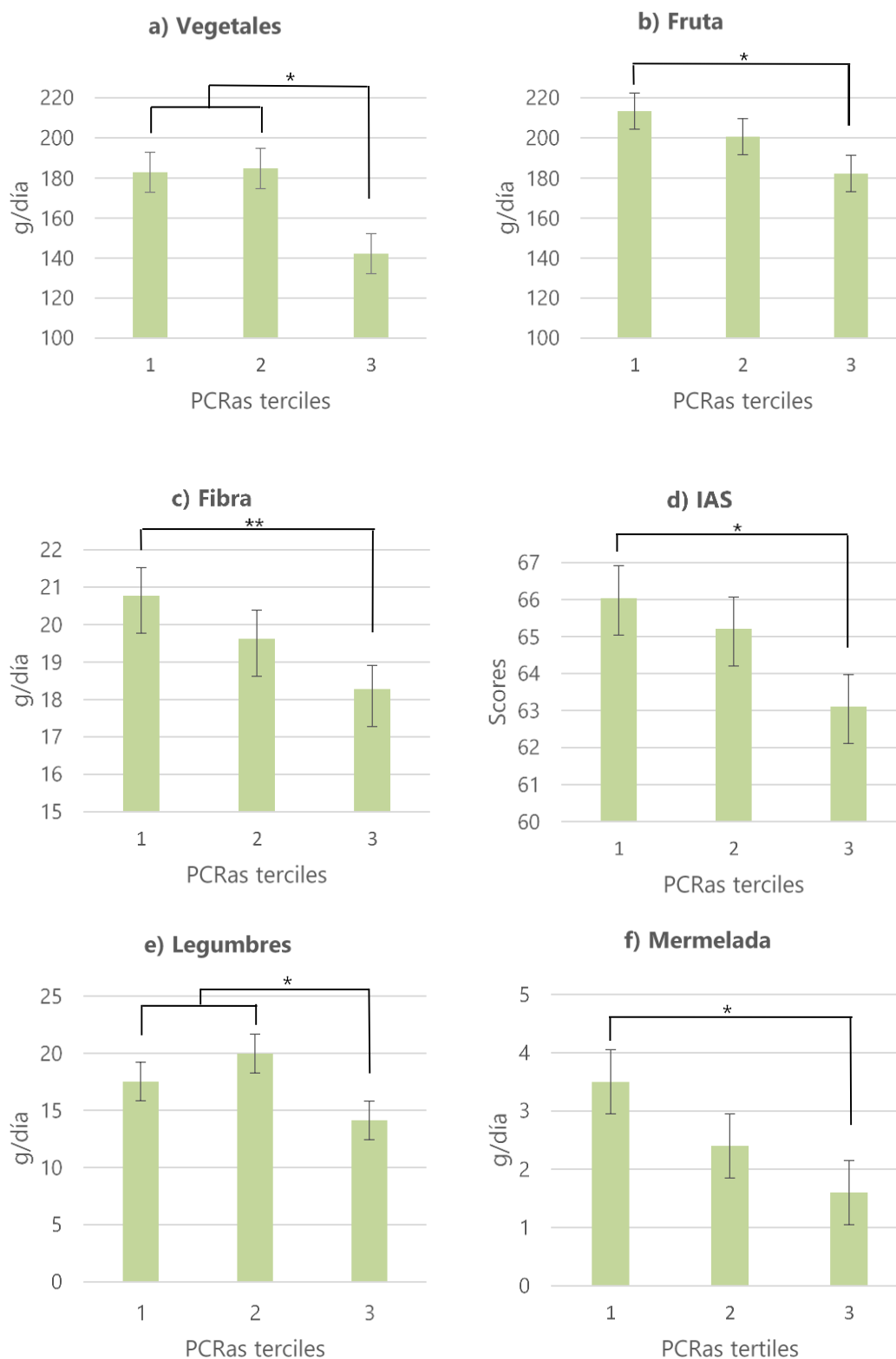
d) Respecto al índice de alimentación saludable (IAS), se observa que en el tercil 3, más alto de PCR, se muestra como el más bajo frente al tercil 1 de PCR (62,8 en el tercil 3 frente a 66,1 en el tercil 1, $p<0,05$).

e) La ingesta de legumbres en el tercil más alto de PCR fue significativamente más baja respecto a los terciles 1 y 2 (13,9 g/día en el tercil 3 frente a 17,2 g/día en los terciles 1-2, $p<0,05$).

f) La ingesta de mermelada en el tercil más alto de PCR fue significativamente más baja respecto al tercil 1 (1,6 g/día en el tercil 3 frente a 3,5 g/día en el tercil 1, $p<0,05$).

No hay diferencias significativas en niños.

Figura 4. Ingesta diaria de vegetales (a), fruta (b), fibra (c), IAS (d), legumbres (e) y mermelada (f) según terciles de PCRas en niñas prepuberales.



ANOVA ajustado por IMC, Tukey o Games-Howell post hoc *p<0,05 **p<0,01

6.4. Patrones dietéticos y su influencia sobre PCR en niños y niñas

Para explorar la influencia de posibles patrones dietéticos sobre los niveles de PCRas (tabla 33) se realizó un análisis factorial de componentes principales. Se examinó la adecuación de la muestra mediante el test de Kaiser-Meyer Olkin (KMO) mostrando un $KMO=0,662$. Como resultados se obtuvieron 4 factores que explicaron el 78% de la variabilidad de la ingesta de alimentos. Los primeros dos factores explicaron la mayor variación en la ingesta.

El primer factor, caracterizado como "dieta alta en vegetales" explicó el 26% de la variabilidad, asociándose de forma positiva y significativa con la ingesta de fibra, fruta y vegetales, y vitaminas A y E. Y negativamente con ácidos grasos saturados.

El segundo factor explicó el 25% de la variabilidad de la ingesta de alimentos, asociándose de forma positiva con la ingesta de grasas, en particular ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, por ello fue nombrado "dieta alta en grasas".

El patrón de dieta alta en vegetales correlacionó negativamente ($-0,132$, $p<0,05$) con PCRas en niñas después de ajustar por IMC. No se encontraron asociaciones entre niveles de PCRas y el patrón de dieta alta en grasas. Tampoco se observaron correlaciones de ninguno de estos patrones con niveles de PCRas en niños.

Tabla 33. Matriz de análisis factorial para dos patrones dietéticos (patrón de dieta alta en vegetales y patrón de dieta alta en grasas) identificados en nuestra población.

	Dieta alta en vegetales	Dieta alta en grasas
Energía	<u>0,786</u>	-0,160
Proteínas (%)	-0,156	0,163
Acidos grasos totales (%)	-0,127	<u>0,921</u>
Acidos grasos saturados (%)	<u>-0,446</u>	<u>0,217</u>
Acidos grasos monoinsaturados (%)	-0,002	<u>0,782</u>
Acidos grasos poliinsaturados (%)	-0,005	<u>0,712</u>
Hidratos de carbono (%)	0,195	<u>-0,853</u>
Hidratos de carbono complejos (%)	0,009	<u>-0,384</u>
Hidratos de carbono simples (%)	0,129	<u>-0,538</u>
Fibra	<u>0,814</u>	<u>-0,307</u>
Vitamina A	<u>0,521</u>	0,710
Vitamina E	<u>0,779</u>	-0,002
Fruta	<u>0,711</u>	<u>-0,239</u>
Fruta y vegetales	<u>0,785</u>	<u>-0,267</u>

Coefficientes ≥ 0.30 contribuyen significativamente en el modelo (valores subrayados)

DISCUSIÓN

La proteína C reactiva es un marcador de inflamación que en situaciones normales y en individuos sanos presenta niveles inferiores a 1 mg/l (Shine *et al* 1981). Estos niveles de PCR aumentan considerablemente por procesos inflamatorios sistémicos, infecciones, enfermedades autoinmunes y cáncer (Yeh y Willerson 2003), pudiendo alcanzar picos bastante elevados en sangre durante los primeros días cuando se produce un estímulo de fase aguda, y descender hasta niveles basales pasadas 19 horas cuando el estímulo cesa (Pepys y Hirsfield 2003).

De hecho, se ha descrito que la PCR participa en todas las etapas de la evolución de la aterosclerosis (Lau *et al* 2005, Yeh 2005), así como en otras enfermedades de origen metabólico como diabetes mellitus (Bastard *et al* 2006, Al-Hamodi *et al* 2014), siendo un marcador útil y accesible para el diagnóstico precoz del riesgo cardiovascular en niños obesos (Soriano-Guillén *et al* 2008).

La aparición de nuevos métodos de alta sensibilidad ha permitido utilizar la PCR como marcador de riesgo cardiovascular. La *American Heart Association* (Asociación Estadounidense de Cardiología) ha establecido rangos de valores de PCR de alta sensibilidad (PCRas) en base a un riesgo cardiovascular, así hombres y mujeres con valores de PCRas por debajo de 1 mg/l poseen bajo riesgo de enfermedad cardiovascular, PCRas con valores entre 1 y 3 mg/l indican riesgo moderado y una PCRas por encima de 3 mg/l revelan valores con alto riesgo de enfermedad cardiovascular (Yeh 2005, Ridker 2016).

La población infantil presenta niveles más bajos de PCR que los adultos, por lo que se asume que los niveles de PCR aumentan con la edad hasta alcanzar los niveles de adultos (Schlenz *et al* 2014). En nuestra población, los niveles de PCR son más elevados en adolescentes con exceso de peso que en niños prepuberales con exceso de peso, pero curiosamente son más bajos en adolescentes con

normopeso que en niños prepuberales con normopeso. *Schlenz y colaboradores*, en el estudio IDEFICS, describe también un descenso de los niveles de PCR con la edad en niños con peso normal de 2 a 11 años (*Schlenz et al* 2014).

En cualquier caso, en nuestro estudio los niveles de PCR están por debajo del nivel de detección del ensayo (0,15 mg/l) en un 37,6 % de niños prepuberales y en un 32,7 % de adolescentes. En el estudio IDEFICS también se describe un alto porcentaje, 44,1%, de niveles de PCR por debajo del nivel de detección de su ensayo (0,2 mg/l) en niños sanos (*Schlenz et al* 2014).

Relación de los niveles de PCRas con IMC y obesidad en niños

La asociación de la obesidad con niveles elevados de PCR se ha descrito en numerosos estudios tanto en adultos como en niños (*Cook et al* 2000, *Oliveira et al* 2008, *Tam et al* 2010, *Choi et al* 2013, *Nappo et al* 2013), estableciendo la proteína C reactiva (PCR) como un importante marcador inflamatorio en condiciones de obesidad.

Estudios de reducción de peso que describen variaciones de los niveles de PCR, demostraron que una pérdida de IMC se asocia a una disminución de los niveles de PCRas (*Tchernof et al* 2002, *Reinehr et al* 2005). Sin embargo, no tenemos conocimiento de que exista ningún estudio longitudinal que analice cómo los cambios en la categoría de peso a través de la infancia afecten a los niveles de PCRas.

En nuestro estudio nos planteamos la hipótesis de que el mantenimiento en el tiempo de un alto índice de masa corporal en los niños puede afectar a los niveles de PCR. Por ello, además de analizar la asociación de los niveles de PCRas con el sobrepeso y la obesidad en niños, nos propusimos evaluar el efecto de los cambios en la categoría de obesidad entre edad la prepuberal y la adolescencia sobre los niveles de PCR.

En nuestro estudio, hemos confirmado una correlación significativa y positiva entre los niveles de PCR y las variables antropométricas: IMC, circunferencia de la cintura, circunferencia de la cadera, índice cintura/cadera y la masa grasa tanto en kilogramos como en porcentaje de masa grasa corporal. Algunos estudios han propuesto (Lau et al 2005) y confirmado la expresión de ARNm de PCR en tejido adiposo humano (Ouchi *et al* 2003, Anty *et al* 2006, Memoli *et al* 2007), lo que podría explicar la asociación de estos niveles de PCR con la masa grasa corporal, ya que el tejido adiposo actuaría como una fuente adicional de síntesis de PCR.

Estudios como el IDEFICS observaron una asociación de altos niveles de PCRas con un aumento del IMC y presencia de sobrepeso/obesidad en niños europeos (Nappo *et al* 2013). Resultados del estudio NHANES ya demostraron que el IMC fue el mejor predictor de los niveles de PCR en niños de 3 a 17 años (Ford 2003). Otros estudios han demostrado una relación de niveles de PCR con componentes relacionados con el síndrome metabólico como son la obesidad y un IMC elevado en niños (Oliveira *et al* 2008).

En el análisis de la influencia de los cambios de categoría de peso entre la edad prepuberal y la adolescencia sobre los niveles de PCRas, hemos observado como era de esperar, que los niños que permanecieron con sobrepeso durante su infancia tenían los niveles más altos de PCRas, pero curiosamente, observamos que los niveles más bajos de PCR se observan en los niños que pasan de exceso de peso en edad escolar a peso normal en la adolescencia. Estos niveles de PCRas fueron casi el doble en adolescentes con sobrepeso que tenían sobrepeso al inicio del estudio que en aquellos adolescentes con sobrepeso a los 6 y 8 años y con normopeso en la adolescencia, lo cual refleja el establecimiento de un estado inflamatorio de bajo grado durante la infancia que es reversible con la disminución de peso del individuo.

Relación de los niveles de PCRas con variables lipídicas

El aumento del tejido adiposo en la obesidad está implicado en el desarrollo de un estado inflamatorio crónico sistémico de bajo grado asociado con las primeras fases de la aterogénesis (Kapiotis *et al* 2006, Berg & Scherer 2005). Paralelamente a su asociación con la obesidad, la PCRas se ha asociado con otros factores de riesgo cardiovascular y síndrome metabólico como es la resistencia a insulina, presión arterial elevada y perfil lipídico alterado (Ridker *et al* 2003, Yudkin *et al* 1999, Cook *et al* 2000, Piché *et al* 2005, Yoshida *et al* 2006, Oliveira *et al* 2008, Nappo *et al* 2013, Al-Hamoudi *et al* 2014).

En nuestro estudio hemos observado una relación entre la PCRas y el metabolismo de HDL, observando una correlación negativa y significativa entre los niveles de PCRas y los niveles de colesterol-HDL y apolipoproteína-AI. Estudios previos en adultos (Yudkin *et al* 1999, Piché *et al* 2005, Al-Hamodi *et al* 2014) y niños (Cook *et al* 2000, Hiura *et al* 2003, Wu *et al* 2003, Yoshida *et al* 2006, Oliveira *et al* 2008, Soriano-Guillén *et al* 2008, Nappo *et al* 2013, Chang *et al* 2015) también han encontrado una asociación de PCR con colesterol-HDL. Sin embargo, hasta la fecha, hay pocos estudios en la literatura que examinen la relación entre los niveles de PCR y la apolipoproteína AI. Los pocos datos publicados proceden de investigaciones en niños de origen asiático con resultados contradictorios. En algunos estudios la asociación con PCR no es significativa (Hiura *et al* 2003, Roh *et al* 2007) y en otros se describe una correlación negativa y significativa con PCR en niños varones (Yoshida *et al* 2006).

Los niveles de PCR se relacionan con la interleuquina 6 (IL-6), citoquina proinflamatoria liberada por el tejido adiposo que actúa sobre el hígado activando la síntesis de PCR (Heinrich *et al* 1990). Alteraciones en los niveles de IL-6 podrían ser responsables indirectamente de los niveles de PCR y del efecto metabólico observado en el metabolismo de HDL, ya que IL-6 actúa sobre la

lipoprotein-lipasa y estimula la lipólisis (Greenberg *et al* 1992, van Hall *et al* 2003).

La asociación entre PCR y los niveles de colesterol-HDL es similar en niños y niñas en edad prepuberal, pero es diferente entre sexos en niños de 12-16 años de edad. La ausencia de diferencias entre sexos en esta asociación en niños prepúberes que sí se observa en niños de 12-16 años de edad podría indicar una influencia hormonal relacionada con la edad. Juonala y colaboradores han descrito correlaciones diferentes entre niveles de PCR y colesterol-HDL en adultos y en niños (Juonala *et al* 2006). En su estudio, los niveles de PCR se asociaron con niveles de colesterol-HDL a una edad de 12-18 años, pero no en adultos (Juonala *et al* 2006).

Respecto a los niveles de triglicéridos, en algunos estudios se muestra una asociación positiva de éstos con los niveles de PCR (Wu *et al* 2003, Oliveira *et al* 2008, Soriano-Guillén *et al* 2008, Roh *et al* 2007); sin embargo, esta asociación no se observó en otros estudios en niños (Nappo *et al* 2013, Ford 2003, Juonala *et al* 2006). En nuestro estudio únicamente se ha objetivado una correlación positiva y significativa de PCR con triglicéridos en niñas prepuberales.

Relación de los niveles de PCRas con resistencia a la insulina

Se sabe que adipocitoquinas derivadas no sólo de los adipocitos sino también de los macrófagos infiltrados, contribuyen a la resistencia a la insulina, y la mayoría de ellas se expresan de manera descontrolada durante la obesidad, las más importantes descritas son la leptina, TNF- α , IL-6 y resistina (Bastard *et al* 2006). Por el contrario, la expresión y los niveles plasmáticos de adiponectina favorecen la acción de la insulina (Bastard *et al* 2006). TNF- α se expresa de manera irregular en el tejido adiposo de varios modelos de roedores de la obesidad y desempeña un papel importante en la aparición de resistencia a la insulina en estas especies (Hotamisligil *et al* 1993). Ambos TNF- α y IL-6 puede alterar la

sensibilidad a la insulina mediante la activación de diferentes pasos clave en la vía de señalización de la insulina (Bastard *et al* 2002, Bastard *et al* 2006).

Estudios en niños y adolescentes obesos han observado una asociación significativa y positiva de los niveles de glucosa, insulina en ayunas y índice de resistencia a insulina (HOMA) con los valores sanguíneos de PCR (Valle *et al* 2005, Wu *et al* 2006). En nuestro trabajo observamos la asociación de altos niveles de PCR con aumentos de insulina y HOMA-IR en niñas prepuberales. Aún así serían necesarios más estudios en niños y adolescentes que investiguen y clarifiquen esta asociación de PCR con variables relacionadas con la resistencia a la insulina como ocurre en adultos.

Relación de los niveles de PCRas con niveles de leptina

La leptina desempeña un papel importante en el desarrollo de la obesidad y de las complicaciones relacionadas con ella (Ren 2004), posiblemente actuando como enlace entre la inflamación y los trastornos metabólicos relacionados con la obesidad (Martin *et al* 2008).

En nuestro estudio hemos observado una asociación importante entre los niveles de PCRas y de leptina en niños de ambas edades que continúa siendo significativa después de ajustar por IMC. Esta asociación se ha confirmado en estudios en adultos (Hribal *et al* 2014). En estos estudios se observó una correlación de leptina y PCR independientemente del IMC (Kazumi *et al* 2003, Shamsuzzaman *et al* 2004, Ble *et al* 2005, Viikari *et al* 2007). Aunque los estudios en niños son escasos, se ha observado una asociación similar a la nuestra en niños no obesos (Stakos *et al* 2014) y obesos (Pires *et al* 2014) caucásicos.

Se ha descrito que la leptina regula la respuesta inmune proinflamatoria de manera que aumenta la expresión de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α

y la activación de macrófagos y a su vez podría promover la síntesis y secreción de PCR (Loffreda *et al* 1998). No obstante, se necesitan estudios adicionales para dilucidar el papel de la leptina en la inflamación de bajo grado observada en niños obesos a través de su influencia en la síntesis de la PCR.

Asociación de polimorfismos del gen PCR con niveles de PCRas

En un intento de aclarar las bases genéticas de los niveles de PCR, han surgido múltiples estudios que tratan de relacionar SNPs en el gen de PCR con sus niveles plasmáticos (Carlson *et al* 2005, Kathiresan *et al* 2006, Danik y Ridker 2007, Hage *et al* 2009) mostrando niveles mayores o menores de PCR dependiendo del SNP estudiado. En nuestra investigación hemos analizado cuatro polimorfismos en el gen de PCR, dos SNPs en la región 3'UTR (rs1205 y rs1130864), un SNP en la región del promotor (rs2794521) y un SNP exónico (rs1800947). Es preciso señalar que las prevalencias que presentan estos polimorfismos en nuestra población, son similares a las descritas en otras poblaciones en adultos (Hage *et al* 2009, Komurcu-Bayrak *et al* 2009).

Con respecto a los SNPs en la región 3'UTR, hemos observado que el alelo minoritario A del polimorfismo rs1205 (G>A) se asocia con niveles más bajos de PCRas y el alelo menor T del SNP rs1130864 (C>T) con niveles más altos de PCR. Estos resultados son consistentes con estudios previos en adultos (Martínez-Calatrava *et al* 2007, Komurcu-Bayrak *et al* 2009, Kong *et al* 2012, Martínez-Calleja *et al* 2012, Lee *et al* 2009, Schumacher *et al* 2009). Se ha descrito que el alelo T del SNP rs1130864 se asocia con una mayor estabilidad del mRNA, y el alelo G del SNP rs1205 con un aumento de la expresión de PCR (Russell *et al* 2004).

Los estudios en niños, sin embargo, son escasos. Sólo hemos encontrado un estudio, que de modo similar al nuestro, describió una asociación del SNP rs1130864 con niveles de PCR en adolescentes mexicanos (Mendoza-Carrera *et*

al 2010).

Similar a nuestros resultados, varios estudios en adultos han encontrado una asociación del alelo minoritario C del SNP rs1800947 con bajos niveles de PCR (Martinez-Calatrava *et al* 2007, Komurcu-Bayrak *et al* 2009, Kong *et al* 2012, Lee *et al* 2009). Cabe señalar que no hemos encontrado ningún estudio que analice la influencia de este SNP con niveles de PCRas en niños.

También hemos encontrado una asociación significativa del SNP rs2794521 en la región promotora del gen PCR con niveles de PCRas, los portadores del alelo mayoritario A poseen niveles de PCR significativamente más altos que los no portadores. Resultados similares han sido publicados en otros estudios (Lee *et al* 2009, Kotlega *et al* 2014). Además, se ha descrito un aumento en la actividad transcripcional del promotor del gen PCR asociado al alelo mayoritario A de este SNP (Wang *et al* 2009).

Del mismo modo, en nuestro estudio se ha confirmado la asociación de los niveles de PCR con haplotipos derivados de estos cuatro SNPs del gen de la PCR, resultando tres haplotipos frecuentes asociados con niveles más bajos de PCRas en nuestros niños. Otros estudios también describen la asociación de haplotipos de PCR y niveles de PCRas en la infancia, además de encontrar diferencias importantes de niveles de PCRas en función de los haplotipos a lo largo de la vida, desde la infancia hasta la vida adulta (Kivimaki *et al* 2007).

Asociación de polimorfismos del gen LEP y LEPR con niveles de PCRas

A pesar de la evidente influencia de SNPs en el gen de la PCR sobre sus niveles plasmáticos, la mayor parte de la variación en los niveles de PCR relacionadas con factores genéticos permanece sin explicar, por ello se ha pensado en otros loci que pudieran contribuir a explicar la variación de los niveles de PCR atribuible a factores genéticos. Dada las semejanzas estructurales y

funcionales de la leptina y su receptor con citoquinas tales como IL-6 (Fantuzzi et al 2000), su relación con la expresión de PCR y la evidencia de la existencia de correlación entre los niveles de PCR y leptina (Nakamura 2013, Stakos *et al* 2014, Hribal *et al* 2014), también descrita en este trabajo, nos propusimos estudiar la relación entre variantes polimórficas del gen de la leptina (LEP) y receptor de la leptina (LEPR) y los niveles de PCR.

En nuestro estudio, hemos demostrado la asociación de polimorfismos del gen LEP (leptina) y LEPR (receptor de la leptina) y niveles de PCRas. Nuestros resultados muestran una asociación del SNP LEP menos común rs7799039 con bajos niveles de PCR y una asociación de los polimorfismos del gen LEPR, rs1137101 y rs1137100 con niveles de PCR más altos. Esta asociación entre los polimorfismos de estos genes y niveles de PCR se mantiene significativa tras ajustar por valores de leptina.

Estudios previos en nuestra población ha demostrado una asociación significativa entre los niveles de leptina y los polimorfismos LEP rs7799039 (G2548A) (Riestra *et al* 2010_a) y LEPR rs1137101 (Q223R) (Riestra *et al* 2010_b) pero no se pudo encontrar ninguna asociación entre los niveles de leptina y el SNP LEPR rs1137100 (K109R) (Riestra *et al* 2010_b) lo que sugiere que la asociación de estos polimorfismos con los niveles de PCR puede ir más allá de su asociación con leptina. Otras variantes genéticas, como rs1805096 y rs1892534, del gen LEPR, también han sido asociadas con niveles de PCR en adultos jóvenes (Curocichin *et al* 2011) y adultos (Ridker *et al* 2008, Reiner *et al* 2012, Zang *et al* 2007, Elliott *et al* 2009).

Curiosamente, hemos encontrado una importante asociación de este SNP rs2794521 en la región del promotor del PCR con niveles de leptina que no se ha observado para los otros tres SNPs estudiados. Los estudios de análisis de asociación de variantes genéticas en el gen PCR con niveles de leptina son escasos. Dos estudios previos que han analizado los SNPs rs1205 y rs1800947

(Welsh *et al* 2010) y haplotipos de PCR (Viikari *et al* 2007), no encontraron ninguna asociación con niveles de leptina. Pero en lo que respecta al SNP rs2794521, no hemos encontrado ningún estudio que analice la asociación de este SNP con niveles de leptina. Por lo que, a nuestro entender, serían necesarios nuevos estudios que investiguen esta asociación en otras poblaciones.

Asociación de polimorfismos del gen PCR con variables antropométricas, resistencia a insulina y perfil lipídico

En la asociación de polimorfismos en el gen de la PCR con variables antropométricas de nuestro estudio no encontramos asociación alguna con el IMC, ni con ninguna variable antropométrica para los polimorfismos analizados (rs1205, rs1130864, rs2794521 y rs1800947). En adultos se ha observado en población de edad avanzada una asociación del alelo G del polimorfismo rs1205 con altos niveles de PCR, así como con IMC y circunferencia de la cintura, y una diferente asociación con la masa grasa entre hombres y mujeres (Eiriksdottir *et al* 2009). Otro SNP de este estudio, rs1800947, también está fuertemente asociado con los niveles de PCR, pero la frecuencia alélica del alelo C es tan baja que es muy difícil observar la posible interacción con IMC (Eiriksdottir *et al* 2009); sin embargo, en niños, existe un estudio en la población infantil del *Taipei Children Heart Study*, donde solo observa que el SNP rs1205 se asocia con variaciones en el IMC y la circunferencia de la cintura, así como con el desarrollo de obesidad (Lin 2011).

Respecto a la asociación de SNPs del gen de PCR con variables relacionadas con la resistencia a la insulina, en nuestros resultados solo se observa una relación significativa del SNP rs1800947 con HOMA y glucosa. De nuevo, los estudios en niños son escasos. En nuestro conocimiento, solo en un estudio realizado en jóvenes mejicanos, encontró asociaciones significativas para el SNP rs1205 con

HOMA-IR y glucosa (Duran-González *et al* 2011). Respecto al perfil lipídico, no encontramos diferencias significativas de este con niveles de PCR. De nuevo los estudios son escasos y los que existen muestran resultados similares a los nuestros, no encontrando asociación de los SNPs rs1205, rs1130864, rs1800947 y rs2794521 con el perfil lipídico y otros factores de riesgo cardiovascular (Schumacher *et al* 2009, Kotlega *et al* 2014).

Relación de la ingesta de alimentos, nutrientes y IAS con niveles de PCRas en niños prepuberales

Junto con los factores genéticos discutidos anteriormente, se piensa que la dieta pudiera ser uno de los factores responsables de modular los niveles de PCRas ya desde la infancia (Del Mar Bibiloni *et al* 2013, González-Gil *et al* 2015). Por ello, en nuestro estudio hemos analizado la asociación de nutrientes y alimentos con niveles de PCRas en niños.

En adultos se ha descrito que una mayor ingesta de frutas y verduras se asocia a niveles más bajos de PCRas (Oliveira *et al* 2009, Esmailzadeh *et al* 2006), asociación que también parece darse en niños (Qureshi *et al* 2009, Gonzalez-Gil *et al* 2016). Sin embargo, esta asociación depende de la edad, el sexo (Gonzalez-Gil *et al* 2016) y de la presencia o no de exceso de peso (Oliveira *et al* 2009). Nuestros resultados reflejan que una ingesta alta de frutas y verduras se asocia con menores niveles de PCR en niñas, constatando diferencias en esta asociación dependiendo del sexo. En algunos estudios en adultos se ha descrito la asociación sólo en los hombres, pero no en mujeres (Oliveira *et al* 2009). El estudio IDEFICS en niños europeos describe diferencias en esta asociación dependiendo de la edad y del sexo, reflejando una asociación de niveles de PCRas con vegetales crudos en niños y niñas mayores y con vegetales cocinados en niñas más jóvenes (Gonzalez-Gil *et al* 2016). La razón de estas diferencias dietéticas entre sexos no

está clara, ya que nuestros niños no muestran diferencias significativas entre sexos en las medias de IMC o en la ingesta de fibra, vitaminas y vegetales, y la posible influencia de hormonas sexuales es muy reducida puesto que todos los niños son prepuberales. Tal vez las diferencias podrían atribuirse a la influencia de las hormonas implicadas en la homeostasis de la energía tales como la leptina, que como venimos discutiendo, correlacionan significativamente con niveles de PCR en nuestra población y presentan diferencias significativas entre sexos (Riestra *et al* 2010_a).

En relación al consumo de legumbres, nuestros resultados muestran una asociación negativa con niveles de PCRas. En la misma línea, otros estudios asocian una reducción de PCR con la ingesta de legumbres (Gonzalez-Gil *et al* 2016, Steckhan *et al* 2016). Asociación también observada en estudios de dieta mediterránea donde las legumbres son uno de los alimentos principales (Sofi *et al* 2008, Estruch 2010, Casas *et al* 2014).

Curiosamente, alimentos específicos como la mermelada, se han asociado significativamente a bajos niveles de PCRas en nuestras niñas. Similar a nuestro hallazgo, una asociación significativa e inversa entre la ingesta de miel/mermelada y niveles de PCRas ha sido documentada en el estudio IDEFICS desarrollado en niños de distintos países europeos (Gonzalez-Gil *et al* 2016). Lamentablemente, la forma de recoger la información nutricional no nos permite tener información del tipo de mermelada consumida por los niños.

Los altos niveles de fibra y antioxidantes asociados a la ingesta de vegetales y frutas podrían contribuir a explicar la asociación entre los niveles de PCRas y el consumo de frutas y verduras. En nuestra población hemos confirmado una ingesta de fibra significativamente más alta en las niñas con niveles más bajos de PCRas. La asociación de la fibra con niveles de PCR se ha descrito en algunos estudios (King *et al* 2007, Estruch *et al* 2009), aunque una revisión de la literatura ha mostrado que a pesar de que la asociación es evidente en estudios

epidemiológicos, estudios de intervención no pudieron encontrar ninguna asociación significativa (Buyken *et al* 2014). A pesar de que se desconoce cómo la fibra tiene el potencial para modular los niveles de PCR, se hipotetiza que podría deberse al efecto que ejerce retardando la absorción de glucosa y modulando la producción de citoquinas inflamatorias por la microflora intestinal (Weickert *et al* 2008).

La ingesta de carbohidratos no presenta asociación con los niveles de PCRas en nuestra población. Otros estudios experimentales sí han observado que la ingesta de carbohidratos simples se relaciona con la aparición de una respuesta proinflamatoria (Oliveira *et al* 2013, Jonasson *et al* 2014). Por otra parte, otros estudios han descrito como los carbohidratos complejos disminuyen el estado proinflamatorio en individuos obesos (Suter 2005).

En nuestro estudio también se ha documentado una asociación inversa de PCRas con vitamina A y vitamina E, confirmando la hipótesis de que estas vitaminas antioxidantes pueden ser responsables de los bajos niveles de PCR. En apoyo de esta teoría, algunos estudios en adultos han encontrado asociaciones inversas entre PCR y otros antioxidantes, como vitamina C, vitamina A y β -caroteno (Oliveira *et al* 2009, Wannamethee *et al* 2006), aunque la asociación no se ha encontrado en niños (Del Mar Bibiloni *et al* 2013).

La asociación de la ingesta de grasas con niveles de PCRas ha sido extensamente estudiada en adultos (Giugliano *et al* 2006, Santos *et al* 2013, Steckhan *et al* 2016) y en algunos estudios en niños (Aeberli *et al* 2006, Del Mar Bibiloni *et al* 2013, Negele *et al* 2015). Estudios transversales han encontrado una asociación positiva entre la ingesta de grasas trans y grasas saturadas y los niveles de PCR (Giugliano *et al* 2006, Santos *et al* 2013), que no ha sido confirmada en estudios intervencionistas (Giugliano *et al* 2006, Santos *et al* 2013). Así, los resultados sobre la posible asociación entre el consumo de un tipo específico de

ácidos grasos y los niveles de PCRas en adultos siguen siendo poco concluyentes (Santos *et al* 2013).

Nuestros resultados reflejan una asociación significativa de alto consumo de grasa saturadas con elevados niveles de PCR en niñas. Estudios similares a los nuestros, observan una asociación de la ingesta de grasas saturadas con PCR en niños suizos de 6 a 14 años de edad (Aeberli *et al* 2006), aunque la asociación no se ha encontrado en niñas mayores (Del Mar Bibiloni *et al* 2013).

La calidad de la dieta total fue medida en nuestros niños mediante el índice de alimentación saludable (IAS) ya que es un buen indicador de la adecuación de la dieta utilizado en numerosos estudios dietéticos (Kennedy *et al* 1995, Freedman *et al* 2010, Argawal *et al* 2015). En las niñas de nuestro estudio hemos encontrado una asociación negativa y significativa entre los niveles de PCR y el IAS. La puntuación del IAS está asociada a una mayor ingesta de verdura y un menor consumo de grasas. Una relación inversa de los niveles de PCR con el IAS también se ha documentado en otros estudios en adultos (Haghighatdoost *et al* 2013, Monfort-Pires *et al* 2014) y niños (Lipsky *et al* 2012, Loprinzi *et al* 2015).

Patrones dietéticos y niveles de PCRas en niños prepuberales

Más allá del análisis de la relación de alimentos y nutrientes con niveles de PCR, resulta de singular importancia identificar y analizar patrones dietéticos. De hecho, existe un elevado número de estudios nutricionales encaminados a encontrar un patrón dietético que disminuya niveles elevados de moléculas inflamatorias observados en sujetos con obesidad (Centritto *et al* 2009, Barbaresko *et al* 2013, Lee *et al* 2014).

Como hemos comentado en nuestro estudio, hemos observado que una ingesta alta en grasas saturadas y baja en fibra y vitaminas está relacionada con

los niveles más altos de PCR en las niñas. En esta línea, hemos identificado un patrón al cual hemos nombrado "*patrón de dieta alta en vegetales*", que se asocia significativamente con bajos niveles de PCR en niñas. Este patrón está caracterizado por una ingesta de fibra muy alta, alto consumo de frutas y verduras y alto consumo de vitamina A y E. En estudios en adultos, patrones dietéticos de alta ingesta en vegetales y frutas, similar al nuestro, se han relacionado con niveles más bajos de PCR, mientras que patrones dietéticos con una ingesta mayor de carne se asociaron positivamente con marcadores de inflamación, principalmente con PCR (Barbaresko *et al* 2013, Lee *et al* 2014).

Queremos destacar que este es el primer estudio que identifica una asociación entre un patrón caracterizado por un alto contenido en frutas y vegetales y bajos niveles de PCRas en niños.

En resumen, podemos concluir que una dieta con alto contenido en fibra y antioxidantes procedentes del consumo de frutas y verduras mejora un estado inflamatorio evaluado mediante la determinación de niveles de PCR ya desde la edad infantil.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los cambios en el grado de obesidad entre la edad prepuberal y la adolescencia influyen notablemente en los valores de PCR, indicando que el estado inflamatorio crónico asociado con la obesidad puede ser reversible al reducir el peso en la infancia, apoyando por ello la utilidad de la medida de PCR en la práctica clínica.

2. Tanto en niños prepúberes como en adolescentes se observa una asociación significativa e inversa de los niveles de PCRas con los niveles de colesterol HDL y Apo AI en ambos sexos, es decir se observa un perfil lipídico desfavorable en presencia de un aumento de PCRas.

3. Los niveles de PCRas se asocian significativamente con los niveles de leptina, independientemente del IMC, lo que sugiere el papel de la leptina como regulador de la respuesta inflamatoria.

4. Hemos confirmado la asociación de los polimorfismos rs1205, rs1130864, rs2794521 y rs1800947 y los haplotipos correspondientes del gen de la PCR con niveles de PCRas en niños prepuberales y adolescentes.

5. Polimorfismos del gen de la leptina y del receptor de la leptina también se asocian con concentraciones de PCRas, contribuyendo de esta forma a explicar la variabilidad interindividual de los niveles de PCRas, atribuida a factores genéticos de otros loci.

6. Un patrón dietético saludable, caracterizado por la presencia de un consumo elevado de fruta, vegetales, fibra, vitaminas A y E, un índice de alimentación saludable elevado y un bajo consumo de grasas saturadas evidencian niveles más bajos de PCR.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aasheim ET, Hofsø D, Hjelmessaeth J, et al. Vitamin status in morbidly obese patients: a cross-sectional study. *Am J Clin Nutr.* 2008; 87: 362-369.
- Abate N. Obesity and cardiovascular disease. Pathogenic role of the metabolic syndrome and therapeutic implications. *J Diabetes Complications.* 2000; 14: 154-174.
- Aeberli I, Molinari L, Spinass G, et al. Dietary intakes of fat and antioxidant vitamins are predictors of subclinical inflammation in overweight Swiss children. *Am J Clin Nutr.* 2006; 84: 748-755.
- Agarwal S, Fulgoni VL, Berg EP. Association of lunch meat consumption with nutrient intake, diet quality and health risk factors in U.S. children and adults: NHANES 2007-2010. *Nutr J.* 2015; 14: 128.
- Aggett PJ, Agostoni C, Axelsson I, et al. Nondigestible carbohydrates in the diets of infants and young children: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003; 36: 329-337.
- Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol.* 2000; 62: 413-437.
- Alexandre A, Miguel M. Dietary fiber in the prevention and treatment of metabolic syndrome: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2008; 48: 905-912.
- Al-Hamodi Z, Al-Habori, Al-Meer, et al. Association of adipokines, leptin/adiponectin ratio and C-reactive protein with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr.* 2014; 16: 6: 99.
- Allain CC, Poon LS, Chan CS, et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem.* 1974; 20: 470-475.
- American Association of Cereal Chemists. The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World report.* 2001; 46: 3.
- Ammirati E, Moroni F, Norata GD, et al. Markers of inflammation associated with plaque progression and instability in patients with carotid atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 718329.
- Anderson HC, McCarty M. Determination of C-reactive protein in the blood as a measure of the activity of the disease process in acute rheumatic fever. *Am J Med* 1950; 8: 445-455.
- Anty R, Bekri S, Luciani N, et al. The inflammatory C-reactive protein is increased in both liver and adipose tissue in severely obese patients independently from metabolic syndrome, Type 2 diabetes, and NASH. *Am J Gastroenterol.* 2006; 101: 1824-1833.
- Assmann G, Schriewer H, Schmitz G, et al. Quantification of high-density-lipoprotein cholesterol by precipitation with phosphotungstic acid/MgCl₂. *Clin Chem.* 1983; 29:

2026-2030.

Baker JL, Olsen LW, Sorensen TI. Childhood body-mass index and the risk of coronary heart disease in adulthood. *N Engl J Med.* 2007; 357: 2329-2337.

Barker DJP. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ.* 1995; 311: 171-174.

Barker DJP. Mothers, babies, and disease in later life. London: BMJ Publishing Group. 1994.

Balistreri CR, Vasto S, Listi F, et al. Association between +1059G/C CRP polymorphism and acute myocardial infarction in a cohort of patients from Sicily: a pilot study. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1067: 276-281.

Barbaresko J, Koch M, Schulze MB, et al. Dietary pattern analysis and biomarkers of low-grade inflammation: a systematic literature review. *Nutr Rev.* 2013; 71: 511-527.

Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science.* 2003; 300: 1524-1525.

Barnard SA, Pieters M, De Lange Z. The contribution of different adipose tissue depots to plasma plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) levels. *Blood Rev.* 2016; 30: 421-429.

Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw.* 2006; 17: 4-12.

Bastard JP, Maachi M, Tran Van Nhieu J, et al. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87: 2084-2089.

Bédard A, Iamarche B, Corneau L, et al. Sex differences in the impact of the Mediterranean diet on systemic inflammation. *Nutr J.* 2015; 14: 46.

Berenson GS, Srinivasan SR, Hunter SM, et al. Risk factors in early life as predictors of adult heart disease: The Bogalusa Heart Study. *Am J Med Sci.* 1989; 298: 141-151.

Berenson GS, Wattigney WA, Tracy RE, et al. Atherosclerosis of the aorta and coronary arteries and cardiovascular risk factors in persons aged 6 to 30 years and studied at necropsy (The Bogalusa Heart Study). *Am J Cardiol.* 1992; 70: 851-858.

Berenson GS, Srinivasan SR, Wattigney WA, et al. Obesity and cardiovascular risk in children. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 699: 93-103.

Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Cir Res.* 2005; 96: 939-949.

Bernaudo FS, Beretta MV, do Nascimento C, et al. Fiber intake and inflammation in type 1 diabetes. *Diabetol Metab Syndr.* 2014; 6: 66.

- Ble A, Windham BG, Bandinelli S, et al. Relation of plasma leptin to C-reactive protein in older adults (from the Invecchiare nel Chianti study). *Am J Cardiol* 2005; 96: 991-995.
- Bochud M, Marquant F, Marques-Vidal PM, et al. Association between C-reactive protein and adiposity in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94: 3969-3977.
- Bonaccio M, Cerletti C, Iacoviello L, et al. Mediterranean diet and low-grade subclinical inflammation: the MOLI-SANI study. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2015; 15: 18-24.
- Bonaccio M, Pounis G, Cerletti C, et al. Mediterranean diet, dietary polyphenols and low-grade inflammation: results from the MOLI-SANI study. *Br J Clin Pharmacol*. 2017; 83: 107-113.
- Booth A, Magnuson A, Fouts J, et al. Adipose tissue: an endocrine organ playing a role in metabolic regulation. *Horm Mol Clin Investig* 2016; 26: 25-42.
- Borst SE. Role of TNF- α in Insulin Resistance. *Endocrine*. 2004; 23: 177-182.
- Boscaro M, Giacchetti G, Ronconi V. Visceral adipose tissue: emerging role of gluco- and mineralocorticoid hormones in the setting of cardiometabolic alterations. *Ann NY Acad Sci*. 2012; 1264: 87-102.
- Bouchenak M, Lamri-Senhadj M. Nutritional quality of legumes, and their role in cardiometabolic risk prevention: a review. *J Med Food*. 2013; 16: 185-198.
- Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem*. 1973; 19: 476-482.
- Burstein, M, Scholnick HR, Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J Lipid Res*. 1970; 11: 583-595.
- Brady WE, Mares-Perlman JA, Bowen P, et al. Human serum carotenoid concentrations are related to physiologic and lifestyle factors. *J Nutr*. 1996; 126: 129-137.
- Brighenti F, Valtueña S, Pellegrini N, et al. Total antioxidant capacity of the diet is inversely and independently related to plasma concentration of high-sensitivity C-reactive protein in adult Italian subjects. *Br J Nutr*. 2005; 93: 619-625.
- Brown MA, Hural J. Functions of IL-4 and control of its expression. *Crit Rev Immunol*. 1997; 17: 1-32.
- Brull DJ, Serrano N, Zito F, et al. Human CRP gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 2063-2069.

- Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, et al. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 285: E527-E533.
- Buyken AE, Goletzke J, Joslowski G, et al. Association between carbohydrate quality and inflammatory markers: systematic review of observational and interventional studies. *Am J Clin Nutr.* 2014; 99: 813-833.
- Calder PC, Ahluwalia N, Albers R, et al. A consideration of biomarkers to be used for evaluation of inflammation in human nutritional studies. *Br J Nutr.* 2013; 109: S1-34.
- Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br J Nutr.* 2011; 106: S5-78.
- Cámara M, Sánchez MC, Torija ME. Frutas y verduras, fuentes de salud. Departamento de Nutrición y Bromatología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Grupo Elba. Ediciones Nutrición y Salud. Madrid. 2003.
- Cancello R, Henegar C, Viguerie N, et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes.* 2005; 54: 2277-2286.
- Cao H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *J Endocrinol.* 2014; 220: T47 - T59.
- Carlson CS, Alfred SF, Lee PK, et al. Polymorphisms within the C-reactive protein (CRP) promoter region are associated with plasma CRP plasma. *Am J Hum Genet.* 2005; 77: 64-77.
- Carrascosa A, Fernández JM, Fernández A, et al. Spanish cross-sectional growth study. Part II. Height, weight and body mass index values from birth to adulthood. *An Pediatr (Barc).* 2008; 68: 552-559.
- Casas R, Sacanella E, Estruch R. The immune protective effect of the Mediterranean diet against chronic low-grade inflammatory diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2014; 14: 245-254.
- Ceddia RB, Koistinen HA, Zierath JR, et al. Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *FASEB J.* 2002; 16: 1163-1176.
- Centritto F, Iacoviello L, di Giuseppe R, et al. Dietary patterns, cardiovascular risk factors and C-reactive protein in a healthy Italian population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009; 19: 697-706.
- Chang CJ, Jian DY, Lin MW, et al. Evidence in obese children: contribution of hyperlipidemia, obesity-inflammation, and insulin sensitivity. *Plos one.* 2015; 10: e0125935.

- Chen J, Zhao J, Huang J, et al. -717A>G polymorphism of human C-reactive protein gene associated with coronary heart disease in ethnic Han Chinese: the Beijing atherosclerosis study. *J Mol Med (Berl)*. 2005; 83: 72-78.
- Chinn S, Rona RJ. International definitions of overweight and obesity for children: a lasting solution? *Ann Hum Biol*. 2002; 29: 306-313.
- Choi J, Joseph L, Pilote L. Obesity and C-reactive protein in various populations: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2013 ;14: 232-244.
- Christiansen T, Richelsen B, Bruun JM. Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects. *Int J Obes*. 2005; 29: 146-150.
- Christou GA, Tellis CC, Elisaf MS, et al. The changes in plasma retinol-binding protein 4 levels are associated with those of the apolipoprotein B-containing lipoproteins during dietary and drug treatment. *Angiology*. 2012; 63: 67-75.
- Chu NF, Rimm EB, Wang DJ, et al. Clustering of cardiovascular disease risk factors among obese schoolchildren: the Taipei Children Heart Study. *Am J Clin Nutr*. 1998; 67: 1141-1146.
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*. 2005; 46: 2347-2355.
- Ciubotaru I, Lee YS, Wander RC. Dietary fish oil decreases C-reactive protein, interleukin-6, and triacylglycerol to HDL-cholesterol ratio in postmenopausal women on HRT. *J Nutr Biochem*. 2003; 14: 513-521.
- Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, et al. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ*. 2000; 320: 1240-1243.
- Cole TJ, Lobstein T. Extended international (IOTF) body mass index cut-offs for thinness, overweight and obesity. *Pediatr Obes*. 2012; 7: 284-294.
- Cook DG, Mendall MA, Whincup PH, et al. C-reactive protein concentration in children: relationship to adiposity and other cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis*. 2000; 149: 139-150.
- Crawford DC, Sanders CL, Qin X, et al. Genetic variation is associated with C-reactive protein levels in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation*. 2006; 114: 2458-2465.
- Curat CA, Miranville A, Sengenès C, et al. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*. 2004; 53: 1285-1288.

- Curocichin G, Wu Y, McDade TW, et al. Single-nucleotide polymorphism at five loci are associated with C-reactive protein levels in a cohort of Filipino young adults. *J Hum Genet.* 2011; 56: 823-827.
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 2009; 360: 1509-1517.
- Danik JS, Ridker PM. Genetic determinants of C-reactive protein. *Curr Atheroscler Rep.* 2007; 9: 195-203.
- Davey Smith G, Lawlor DA, Harbord R, et al. Association of C-reactive protein with blood pressure and hypertension: life course confounding and mendelian randomization tests of causality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 1051-1056.
- De Souza RJ, Mente A, Maroleanu A, et al. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ.* 2015; 351: h3978.
- Del Mar Bibiloni M, Maffei C, Llompart I, et al. Dietary factors associated with subclinical inflammation among girls. *Am J Clin Nutr.* 2013; 67: 1264-1270.
- Dietz WH. Overweight and precursors of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *J Pediatr.* 2001; 138: 453-454.
- Du H, van der A DL, van Bakel MM, et al. Glycemic index and glycemic load in relation to food and nutrient intake and metabolic risk factors in a Dutch population. *Am J Clin Nutr.* 2008; 87: 655-661.
- Duran-Gonzalez J, Ortiz I, Gonzales E, et al. Association study of candidate gene polymorphisms and obesity in a Young Mexican-American population from South Texas. *Arch Med Res.* 2011; 42: 523-531.
- Eiriksdottir G, Smith AV, Aspelund T, et al. The interaction of adiposity with the CRP gene affects CRP levels: age, gene/environment susceptibility Reykjavik study. *Int J Obes (Lond).* 2009; 33: 267-272.
- El-Aziz TA, Mohamed RH. Human C-reactive protein gene polymorphism and metabolic syndrome are associated with premature coronary artery disease. *Gene.* 2013; 532: 216-221.
- Elliott P, Chambers JC, Zhang W, et al. Genetic loci associated with C-reactive protein levels and risk of coronary heart disease. *JAMA.* 2009; 302: 37-48.
- Ekmekci H, Ekmekci OB. The role of adiponectin in atherosclerosis and thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2006; 12: 163-168.
- Escudero Alvarez E, González Sánchez P. Dietary fibre. *Nutr Hosp.* 2006; 21: 60-71, 61-72.

- Esmailzadeh A, Kimiagar M, Mehrabi Y, et al. Fruit and vegetable intakes, C-reactive protein, and the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* 2006; 84: 1489-1497.
- Estruch R. Anti-inflammatory effects of the Mediterranean diet: the experience of the PREDIMED study. *Proc Nutr Soc*. 2010; 69: 333-340.
- Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, et al. Effects of dietary fibre intake on risk factors for cardiovascular disease in subjects at high risk. *J Epidemiol Community Health*. 2009; 63: 582-588.
- Edwards CA, Xie C, Garcia AL. Dietary fibre and health in children and adolescents. *Proc Nutr Soc*. 2015; 74: 292-302.
- Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, et al. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 2004; 145: 2273-2282.
- Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115: 911-9, quiz 920.
- Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol*. 2000; 68: 437-446.
- FAO alimentación y nutrición. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana Consulta de expertos. ISSN 1014-2916 FAO ISBN 978-92-5-3067336.
- Fernández JR, Redden DT, Pietrobelli A, et al. Waist circumference percentiles in nationally representative samples of African-American, European-American, and Mexican-American children and adolescents. *J Pediatr*. 2004; 145: 439-444.
- Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, et al. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes*. 2007; 56: 1010-1013.
- Ford ES. C-reactive protein concentration and cardiovascular disease risk factors in children: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2000. *Circulation*. 2003; 108: 1053-1058.
- Freedman LS, Guenther PM, Krebs-Smith SM, et al. A population's distribution of Healthy Eating Index-2005 component scores can be estimated when more than one 24-hour recall is available. *J Nutr*. 2010; 140: 1529-1534.
- Freese R, Vaarala O, Turpeinen AM, et al. No difference in platelet activation or inflammation markers after diets rich or poor in vegetables, berries and apple in healthy subjects. *Eur J Nutr*. 2004; 43: 175-182.
- Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83: 847-850.

- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18: 499-502.
- Friedland O, Nemet D, Gorodnitsky N, et al. Obesity and lipid profiles in children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2002; 15: 1011-1016.
- Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, et al. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 280: E827-E847.
- Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science.* 2005; 307: 426-430.
- Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 316: 129-139.
- Garcés C, de Oya M. Cardiovascular risk factors in children. Main findings of the Four Provinces study. *Rev Esp Cardiol.* 2007; 60: 517-524.
- Garcés C, de Oya I, López-Simón L, et al. Hormone levels in 12-15 year old boys and girls in Spain. Relationship with anthropometric variables. *Clin Biochem.* 2008; 41: 621-624.
- Garcés C, Gutiérrez-Guisado J, Benavente M, et al. Obesity in Spanish schoolchildren: relationship with lipid profile and with insulin resistance. *Obes Res.* 2005; 13: 959-963.
- Garcés C, Cano B, Lasunción MA, et al. Dehydroepiandrosterone sulfate and high density lipoprotein-cholesterol in overweight children. *Obesity.* 2007; 15: 1147-1154.
- Gavela-Pérez T, Navarro P, Soriano-Guillén L, et al. High Prepubertal Leptin Levels Are Associated With Earlier Menarcheal Age. *J Adolesc Health.* 2016; 59: 177-181.
- Gavela-Pérez T, Garcés C, Navarro-Sánchez P, et al. Earlier menarcheal age in Spanish girls is related with an increase in body mass index between pre-pubertal school age and adolescence. *Pediatr Obes.* 2015; 10: 410-415.
- Gerriets VA, MacIver NJ. Role of T cells in malnutrition and obesity. *Front Immunol.* 2014; 5: 379.
- Giugliano D, Ceriello A, Esposito K. The effects of diet on inflammation: emphasis on the metabolic syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48: 677-685.
- González-Gil EM, Santabárbara J, Russo P, et al. Food intake and inflammation in European children: the IDEFICS study. *Eur J Nutr.* 2016; 55: 2459-2468.
- González-Gross M, Castillo MJ, Moreno L, et al. Alimentación y Valoración del Estado Nutricional de los Adolescentes Españoles (Proyecto AVENA). Evaluación de riesgos y propuesta de intervención. I. Descripción metodológica del estudio. *Nutr Hosp.* 2003; 18: 15-27.

- Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh J, et al. Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer Res.* 1992; 52: 4113-4116.
- Grönroos P, Raitakari OT, Kähönen M, et al. Association of high sensitive C-reactive protein with apolipoprotein E polymorphism in children and young adults: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Clin Chem Lab Med.* 2008; 46: 179-186.
- Guenther PM, Reedy J, Krebs-Smith SM. Development of the Healthy Eating Index-2005. *J Am Diet Assoc.* 2008; 108: 1896-1901.
- Guenther PM, Casavale KO, Reedy J, et al. Update of the Healthy Eating Index: HEI-2010. *J Acad Nutr Diet.* 2013; 113: 569-580.
- Guran O, Akalin F, Ayabakan C, et al. High-sensitivity C-reactive protein in children at risk for coronary artery disease. *Acta Paediatr.* 2007; 96: 1214-1219.
- Hage FG, Szalai AJ. The role of C-reactive protein polymorphism in inflammation and cardiovascular risk. *Curr Atheroscler Rep.* 2009; 11: 124-130.
- Haghighatdoost F, Sarrafzadegan N, Mohammadifard N, et al. Healthy eating index and cardiovascular risk factors among Iranians. *J Am Coll Nutr.* 2013; 32: 111-121.
- Hajer GR, Van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J.* 2008; 29: 2959-2971.
- Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.* 1990; 265: 621-636.
- Hernández M, Castellet J, Narvaiza JL, et al. Curvas y tablas de crecimiento. Instituto de Investigación sobre Crecimiento y Desarrollo, Fundación Faustino Orbegozo. Madrid: Editorial Garsi; 1988.
- Herouvi D, Karanasios E, Karayianni C, et al. Cardiovascular disease in childhood: the role of obesity. *Eur J Pediatr.* 2013; 172: 721-732.
- Hiura M, Kikuchi T, Nagasaki K, et al. Elevation of serum C-reactive protein levels is associated with obesity in boys. *Hypertens Res.* 2003; 26: 541-546.
- Hooper L, Martin N, Abdelhamid A, et al. Reduction in saturated fat intake for cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015; CD011737.
- Horn F, Henze C, Heidrich K. Interleukin-6 signal transduction and lymphocyte function. *Immunobiology.* 2000; 202: 151-167.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993; 259: 87-91.
- Hribal ML, Fiorentino TV, Sesti G. Role of C reactive protein (CRP) in leptin resistance. *Curr Pharm Des.* 2014; 20: 609-615.

- Iacobellis G, Ribaudo MC, Zappaterreno A, et al. Prevalence of uncomplicated obesity in an Italian obese population. *Obes Res.* 2005; 13: 1116–1122.
- Ishibashi J, Seale P. Medicine. Beige can be slimming. *Science.* 2010; 328: 1113–1114.
- Järvisalo MJ, Harmoinen A, Hakanen M, et al. Elevated serum C-reactive protein levels and early arterial changes in healthy children. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 1323-1328.
- Jenkins DJ, Wolever TM, Taylor RH, et al. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am J Clin Nutr.* 1981; 34: 362-366.
- Jialal I, Kaur H, Devaraj S. Toll-like receptor status in obesity and metabolic syndrome: a translational perspective. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99: 39-48.
- Jonasson L, Guldbrand H, Lundberg AK, et al. Advice to follow a low carbohydrate diet has a favourable impact on low-grade inflammation in type 2 diabetes compared with advice to follow a low-fat diet. *Ann Med.* 2014; 46: 182-187.
- Juonala M, Viikari JS, Rönnekaa T, et al. Childhood C-reactive protein in predicting CRP and carotid intima-media thickness in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 1883-1888.
- Kanda H, Tateya S, Tamori Y, et al. Mcp-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 2006; 116: 1494-1505.
- Kaplotis S, Holzer G, Schaller G, et al. A proinflammatory state is detectable in obese children and is accompanied by functional and morphological vascular changes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 2541-2546.
- Kardys I, de Maat MP, Uitterlinden AG, et al. C-reactive protein gene haplotypes and risk of coronary heart disease: the Rotterdam Study. *Eur Heart J.* 2006; 27: 1331-1337.
- Katcher HI, Legro RS, Kunesman AR, et al. The effects of a whole grain-enriched hypocaloric diet on cardiovascular disease risk factors in men and women with metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr.* 2008; 87: 79-90.
- Kathiresan S, Larson MG, Vasan RS, et al. Contribution of clinical correlates and 13 C-reactive protein gene polymorphisms to interindividual variability in serum C-reactive protein level. *Circulation.* 2006; 113: 1415-1423.
- Kazumi T, Kawaguchi A, Hirano T, et al. C-reactive protein in young, apparently healthy men: associations with serum leptin, QTc interval, and high-density lipoprotein-cholesterol. *Metabolism.* 2003; 52: 1113-1116.

- Kennedy ET, Ohls J, Carlson S, et al. The Healthy Eating Index: design and applications. *J Am Diet Assoc.* 1995; 95: 1103-1108.
- Kimbrell DA, Beutler B. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet.* 2001; 2: 256-267.
- King DE, Egan BM, Woolson RF, et al. Effect of a high-fiber diet versus a fiber-supplemented diet on C-reactive protein level. *Arch Intern Med.* 2007; 167: 502-506.
- Kivimäki M, Lawlor DA, Smith GD, et al. Variants in the CRP gene as a measure of lifelong differences in average C-reactive protein levels: the Cardiovascular Risk in Young Finns study, 1980-2001. *Am J Epidemiol.* 2007; 166: 760-764.
- Ko BJ, Park KH, Shin S, et al. Diet quality and diet patterns in relation to circulating cardiometabolic biomarkers. *Clin Nutr.* 2016; 35: 484-490.
- Koh KK, Han SH, Quon MJ. Inflammatory markers and the metabolic syndrome: insights from therapeutic interventions. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 46: 1978-1985.
- Komurcu-Bayrak E, Erginel-Unaltuna N, Onat A, et al. Association of C-reactive protein (CRP) gene allelic variants with serum CRP levels and hypertension in Turkish adults. *Atherosclerosis.* 2009; 206: 474-479.
- Kong H, Qian YS, Tang XF, et al. C-reactive protein (CRP) gene polymorphism, CRP levels and risk of incident essential hypertension: findings from an observational cohort of Han Chinese. *Hypertens Res.* 2012; 35: 1019-1023.
- Kotłęga D, Białecka M, Kurzawski M, et al. Risk factor of stroke and -717A>G (rs2794521) CRP gene polymorphism among stroke patients in West Pomerania province of Poland. *Neurol Neurochir Pol.* 2014; 48: 30-34.
- Lau DC, Dhillon B, Yan H, et al. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 288: H2031-H2041.
- Leadbeatter S, Wawman HM, Jasani B. Further evaluation of immunocytochemical staining in the diagnosis of early myocardial ischaemic/hypoxic damage. *Forensic Sci Int.* 1990; 45: 135-141.
- Lee JY, Hwang DH. Dietary fatty acids and eicosanoids. In Chow, C.K., ed. *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*, pp. 713-739. CRC Press, London, UK. 2008.
- Lee CC, You NC, Song Y, et al. Relation of genetic variation in the gene coding for C-reactive protein with its plasma protein concentrations: findings from the Women's Health Initiative Observational Cohort. *Clin Chem.* 2009; 55: 351-360.
- Lee H, Lee IS, Choue R. Obesity, inflammation and diet. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2013; 16: 143-152.

- Lee Y, Kang D, Lee SA. Effect of dietary patterns on serum C-reactive protein level. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014; 24: 1004-1011.
- Levitan EB, Cook NR, Stampfer MJ, et al. Dietary glycemic index, dietary glycemic load, blood lipids, and C-reactive protein. *Metabolism*. 2008; 57: 437-443.
- Li R, Chen LZ, Zhao SP, et al. Inflammation activation contributes to adipokine imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Plos One*. 2016; 11: e0151916.
- Li SP, Liu TY, Goldman ND. Cis-acting elements responsible for interleukin-6 inducible C-reactive protein gene expression. *J Biol Chem*. 1990; 265: 4136-4142.
- Lin FH, Chu NF, Lee CH, et al. Combined effect of C-reactive protein gene SNP +2147 A/G and interleukin-6 receptor gene SNP rs2229238 C/T on anthropometric characteristics among school children in Taiwan. *Int J Obes (Lond)*. 2011; 35: 587-594.
- Lipsky LM, Cheon K, Nansel TR, et al. Candidate measures of whole plant food intake are related to biomarkers of nutrition and health in the US population (National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002). *Nutr Res*. 2012; 32: 251-259.
- Lo JC, Ljubicic S, Leibiger B, et al. Adipsin is an adipokine that improves β cell function in diabetes. *Cell*. 2014; 158: 41-53.
- Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J*. 1998; 12: 57-65.
- Lolmède K, Durand de Saint Front V, Galitzky J, et al. Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003; 27: 1187-1195.
- López-García E, Schulze MB, Manson JE, et al. Consumption of (n-3) fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial activation in women. *J Nutr*. 2004; 134: 1806-1811.
- López-García E, Schulze MB, Meigs JB, et al. Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. *J Nutr*. 2005; 135: 562-566.
- Loprinzi PD, Lee IM, Andersen RE, et al. Association of concurrent healthy eating and regular physical activity with cardiovascular disease risk factors in U.S. youth. *Am J Health Promot*. 2015; 30: 2-8.
- Maachi M, Piéroni L, Bruckert E, et al. Systemic low grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNFa, leptin and IL-6 levels in obese women. *Int J Obes*. 2004; 28: 993-997.
- Maffeis C, Silvagni D, Bonadonna R, et al. Fat cell size, insulin sensitivity, and inflammation in obese children. *J Pediatr*. 2007; 151: 647-652.

- Mandrup-Poulsen T. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia*. 1996; 39: 1005-1029.
- Marcovina SM, Albers JJ, Henderson LO, et al. International Federation of Clinical Chemistry standardization project for measurements of apolipoproteins A-I and B. III. Comparability of apolipoprotein A-I values by use of international reference material. *Clin Chem*. 1993; 39: 773-781.
- Martin SS, Qasim A, Reilly MP. Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 52: 1201-1210.
- Martínez-Calatrava MJ, González-Sánchez JL, Martínez-Larrad MT. Common haplotypes of the C-reactive protein gene and circulating leptin levels influence the interindividual variability in serum C-reactive protein levels. The Segovia study. *Thromb Haemost*. 2007; 98: 1088-1095.
- Martínez-Calleja A, Quiróz-Vargas I, Parra-Rojas I, et al. Haplotypes in the CRP gene associated with increased BMI and levels of CRP in subjects with type 2 diabetes or obesity from Southwestern Mexico. *Exp Diabetes Res*. 2012; 2012: 982683.
- Mataix J, MM, Llopis J. Tabla de composición de alimentos españoles, Editorial Universidad de Granada, Campus Universitario de Cartuja, 1998.
- Matsuo Y, Hashizume T, Shioji S, et al. Metabolic syndrome is strongly associated with chronic subclinical inflammation in patients achieving optimal low-density lipoprotein-cholesterol levels in secondary prevention of cardiovascular disease. *Circ J*. 2008; 72: 2046-2050.
- Mauras N, Delgiorno C, Kollman C, et al. Obesity without established comorbidities of the metabolic syndrome is associated with a proinflammatory and prothrombotic state, even before the onset of puberty in children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95: 1060-1068.
- Mendoza-Carrera F, Ramírez-López G, Ayala-Martínez NA, et al. influence of CRP, IL-6, and TNFA gene polymorphisms on circulating levels of C-reactive protein in mexican adolescents. *Arch Med Res*. 2010; 41: 472-477.
- McCarty M, Avery OT. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types III. An improved method for the isolation of the transforming substance and its application to pneumococcus types II, III, and IV. *J Exp Med*. 1946; 83: 97-104.
- McGill HC Jr, McMahan CA, Herderick EE, et al. Obesity accelerates the progression of coronary atherosclerosis in young men. *Circulation*. 2002; 105: 2712-2718.
- Memoli B, Procino A, Calabró P, et al. Inflammation may modulate IL-6 and C-reactive protein gene expression in the adipose tissue: the role of IL-6 cell membrane receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007; 293: E1030-E1035.

- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82: 4196-4200.
- Monfort-Pires M, Folchetti LD, Previdelli AN, et al. Healthy Eating Index is associated with certain markers of inflammation and insulin resistance but not with lipid profile in individuals at cardiometabolic risk. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2014; 39: 497-502.
- Morand C, Dubray C, Milenkovic D, et al. Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr.* 2011; 93: 73-80.
- Moreiras-Varela O, CAyCL. Tablas de composición de alimentos, Ediciones Pirámide. Madrid, 1999.
- Nanri H, Nakamura K, Hara M, et al. Association between dietary pattern and serum C-reactive protein in Japanese men and women. *J Epidemiol.* 2011; 21: 122-131.
- Nakamura Y, Ueshima H, Okuda N, et al. Relation of serum leptin and adiponectin level to serum C-reactive protein: the INTERLIPID study. *Int J Vasc Med.* 2013; 2013: 601364.
- Nappo A, Iacoviello L, Fraterman A, et al. High-sensitivity C-reactive protein is a predictive factor of adiposity in children: results of the identification and prevention of dietary- and lifestyle-induced health effects in children and infants (IDEFICS) study. *J Am Heart Assoc.* 2013; 2: e000101.
- National Institute of Health (NIH) NH, L, and Blood Institute's (NHLBI), North American Association for the Study of Obesity (NAASO). The practical guide: Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults, NIH; Bethesda. 2000.
- Navarro SL, Kantor ED, Song X, et al. Factors associated with multiple biomarkers of systemic inflammation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016; 25: 521-531.
- Negele L, Schneider B, Ristl R, et al. Effect of a low-fat diet enriched either with rapeseed oil or sunflower oil on plasma lipoproteins in children and adolescents with familial hypercholesterolaemia. Results of a pilot study. *Eur J Clin Nutr.* 2015; 69: 337-343.
- Nilsson A, Ostman E, Preston T, et al. Effects of GI vs content of cereal fibre of the evening meal on glucose tolerance at a subsequent standardized breakfast. *Eur J Clin Nutr.* 2008; 62: 712-720.
- North CJ, Venter CS, Jerling JC. The effects of dietary fibre on C-reactive protein, an inflammatory marker predicting cardiovascular disease. *Eur J Clin Nutr.* 2009; 63: 921-933.
- Oda E. The metabolic syndrome as a concept of adipose tissue disease. *Hypertens res.* 2008; 431: 1283-1291.

- Oliveira AC, Oliveira AM, Adan LF, et al. C-reactive protein and metabolic syndrome in youth: a strong relationship? *Obesity* (Silver Spring). 2008; 16: 1904-1908.
- Oliveira A, Rodriguez-Artalejo F, Lopes C. The association of fruits, vegetables, antioxidant vitamins and fibre intake with high-sensitivity C-reactive protein: sex and body mass index interactions. *Eur J Clin Nutr*. 2009; 63: 1345-1352.
- Oliveira Fuster, Gabriel. *Manual de Nutrición Clínica*. Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid. 2000.
- Oliveira MC, Menezes-Garcia Z, Henriques MC, et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. *Obesity*. 2013; 21: E396-E406.
- Organización Mundial de la Salud. *Estrategia Mundial sobre régimen alimentario, actividad física y salud*. 57ª Asamblea Mundial de la Salud. 2004.
- Ortega RM, López-Sobaler AM. Grupo de Investigación de la Universidad Complutense de Madrid-VALORNUT. "Estudio ALADINO 2013. Estudio de Vigilancia del Crecimiento, Alimentación, Actividad Física, Desarrollo Infantil y Obesidad en España. 2013". Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Madrid. 2014.
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signalling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation*. 2000; 102: 1296-1301.
- Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, et al. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation*. 2003; 107: 671-674.
- PAIDOS' 84. *Estudio epidemiológico sobre nutrición y obesidad infantil*. Madrid: Jomagar; 1985.
- Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*. 2003; 111: 1805-1812.
- Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice. *Circulation*. 2003; 107: 499-511.
- Pérez-Farinós N, López-Sobaler AM, Dal Re MÁ, et al. The ALADINO study: a national study of prevalence of overweight and obesity in Spanish children in 2011. *Biomed Res Int*. 2013; 2013: 163687.
- Piché ME, Lemieux S, Weisnagel SJ, et al. Relation of high-sensitivity C-reactive protein, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and fibrinogen to abdominal adipose tissue, blood pressure, and cholesterol and triglyceride levels in healthy postmenopausal women. *Am J Cardiol*. 2005; 96: 92-97.

- Pires A, Martins P, Pereira AM, et al. Pro-inflammatory triggers in childhood obesity: correlation between leptin, adiponectin and high-sensitivity C-reactive protein in a group of obese Portuguese children. *Rev Port Cardiol*. 2014; 33: 691-697.
- Pischon T, Girman CJ, Rifai N, et al. Association between dietary factors and plasma adiponectin concentrations in men. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81: 780-786.
- Pittas AG, Roberts SB, Das SK, et al. The effects of the dietary glycemic load on type 2 diabetes risk factors during weight loss. *Obesity (Silver Spring)*. 2006; 14: 2200-2209.
- Portela ML (1994). *Vitaminas y minerales en nutrición*. Buenos Aires: López Libreros.
- Poulain-Godefroy O, Le Bacquer O, Plancq P, et al. Inflammatory role of Toll-like receptors in human and murine adipose tissue. *Mediators Inflamm*. 2010; 2010: 823486.
- Power C, Lake JK, Cole TJ. Measurement and long-term health risks of child and adolescent fatness. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997; 21, 507-526.
- Qi L, Meigs JB, Liu S, et al. Dietary fibers and glycemic load, obesity, and plasma adiponectin levels in women with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006; 29: 1501-1505.
- Qi L, Rifai N, Hu FB. Interleukin-6 receptor gene, plasma C-reactive protein, and diabetes risk in women. *Diabetes*. 2009; 58: 275-278.
- Qureshi NM, Singer MR, Moore LL. A cross-sectional study of food group intake and C-reactive protein among children. *Nutr Metab (Lond)*. 2009; 6: 40.
- Rajaie S, Azadbakht L, Saneei P, et al. Comparative effects of carbohydrate versus fat restriction on serum levels of adipocytokines, markers of inflammation, and endothelial function among women with the metabolic syndrome: a randomized cross-over clinical trial. *Ann Nutr Metab*. 2013; 63: 159-167.
- Rajala MW, Scherer PE. The adipocyte: at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology*. 2003; 144: 3765-3773.
- Reiner AP, Beleza S, Franceschini N, et al. Genome-wide association and population genetic analysis of C-reactive protein in African American and Hispanic American women. *Am J Hum Genet*. 2012; 91: 502-512.
- Reinehr T, Stoffel-Wagner B, Roth CL, et al. High-sensitive C-reactive protein, tumor necrosis factor alpha, and cardiovascular risk factors before and after weight loss in obese children. *Metabolism*. 2005; 54: 1155-1161.
- Ren B. Protein Kinase D1 Signaling in Angiogenic Gene Expression and VEGF-Mediated Angiogenesis. *Front Cell Dev Biol*. 2016; 4: 37.

- Ren J. Leptin and hyperleptinemia-from friend to foe for cardiovascular function. *J Endocrinol.* 2004; 181: 1-10.
- Retnakaran R, Hanley AJ, Connelly PW, et al. Low serum levels of high-molecular weight adiponectin in Indo-Asian women during pregnancy: evidence of ethnic variation in adiponectin isoform distribution. *Diabetes Care.* 2006; 29: 1377-1379.
- Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation.* 2003; 107: 363-369.
- Ridker PM, Cook N. Clinical usefulness of very high and very low levels of C-reactive protein across the full range of Framingham Risk Scores. *Circulation.* 2004; 109: 1955-1959.
- Ridker PM, Pare G, Parker A, et al. Loci related to metabolic-syndrome pathways including LEPR, HNF1A, IL6R, and GCKR associate with plasma C-reactive protein: the Women's Genome Health Study. *Am J Hum Genet.* 2008; 82: 1185-1192.
- Ridker PM. A test in context: high-sensitivity C-reactive protein. *J Am Coll Cardiol.* 2016; 67: 712-723.
- Riestra P, García-Anguita A, Schoppen S, et al. Sex-specific association between leptin receptor polymorphisms and leptin levels and BMI in healthy adolescents. *Acta Paediatr.* 2010; 99: 1527-1530.
- Riestra P, García-Anguita A, Viturro E, et al. Influence of the leptin G-2548A polymorphism on leptin levels and anthropometric measurements in healthy Spanish adolescents. *Ann Hum Genet.* 2010; 74: 335-339.
- Rizk NM, Yousef M. Association of lipid profile and waist circumference as cardiovascular risk factors for overweight and obesity among school children in Qatar. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2012; 5: 425-432.
- Rocchini AP. Childhood obesity and a diabetes epidemic. *N Engl J Med.* 2002; 346: 854-855.
- Rodríguez Artalejo F, Garcés C, Gil A, et al. [The 4 Provinces Study: its principal objectives and design. The Researchers of the 4 Provinces Study]. *Rev Esp Cardiol.* 1999; 52: 319-326.
- Rodríguez-Artalejo F, Garcés C, Gorgojo L, et al. Dietary patterns among children aged 6-7 years in four spanish cities with widely differing cardiovascular mortality. *Eur J Clin Nutr.* 2002; 56: 141-148.
- Roh EJ, Lim JW, Ko KO, et al. A useful predictor of early atherosclerosis in obese children: serum high-sensitivity C-reactive protein. *J Korean Med Sci.* 2007; 22: 192-197.
- Russell AI, Cunninghame-Graham DS, Shepherd C, et al. Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet.* 2004; 13: 137-147.

- Salas-Salvadó J, García-Arellano A, Estruch R, et al. Components of the Mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease. *Eur J Clin Nutr*. 2008; 62: 651-659.
- Salmerón J, Manson JE, Stampfer MJ, et al. Dietary fiber, glycemic load, and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. *JAMA*. 1997; 277: 472-477.
- Santos S, Oliveira A, Lopes C. Systematic review of saturated fatty acids on inflammation and circulating levels of adipokines. *Nutr Res*. 2013; 33: 687-695.
- Schlenz H, Intemann T, Wolters M, et al. C-reactive protein reference percentiles among pre-adolescent children in Europe based on the IDEFICS study population. *Int J Obes (Lond)*. 2014; 38: S26-S31.
- Schumacher W, Cockcroft J, Timpson NJ, et al. Association between C-reactive protein genotype, circulating levels, and aortic pulse wave velocity. *Hypertension*. 2009; 53: 150-157.
- SEEDO. Consenso SEEDO 2000 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med Clín (Barc)*. 2000; 115, 587-597.
- Serra Majem L, Ribas Barba L, Aranceta Bartrina J, et al. Epidemiología de la obesidad infantil en España. Resultados del estudio EnKid (1998-2000). Ed Masson, 2001: 81-108.
- Shamsuzzaman AS, Winnicki M, Wolk R, et al. Independent association between plasma leptin and C-reactive protein in healthy humans. *Circulation*. 2004; 109: 2181-2185.
- Shea S, Aymong E, Zybert P, et al. Fasting plasma insulin modulates lipid levels and particle sizes in 2- to 3-year-old children. *Obes Res*. 2003; 11: 709-721.
- Shen C, Sun X, Wang H, et al. Association study of CRP gene and ischemic stroke in a Chinese Han population. *J Mol Neurosci*. 2013; 49: 559-566.
- Shikany JM, Phadke RP, Redden DT, et al. Effects of low- and high-glycemic index/glycemic load diets on coronary heart disease risk factors in overweight/obese men. *Metabolism*. 2009; 58: 1793-1801.
- Shine B, de Beer FC, Pepys MB. Solid phase radioimmunoassay for C-reactive protein. *Clin Chim Acta*. 1981; 117: 13-23.
- Short KR, Blackett PR, Gardner AW, et al. Vascular health in children and adolescents: effects of obesity and diabetes. *Vasc Health Risk Manag*. 2009; 5: 973-990.
- Sinha R, Fisch G, Teague B, et al. Prevalence of impaired glucose tolerance among children and adolescents with marked obesity. *N Engl J Med*. 2002; 346: 802-810.

- Smyth S, Heron A. Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nat Med*. 2005; 12: 75-80.
- Sofi F, Cesari F, Abbate R, et al. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ*. 2008; 337: a1344.
- Soriano-Guillén L, Hernández-García B, Pita J, et al. High-sensitivity C-reactive protein is a good marker of cardiovascular risk in obese children and adolescents. *Eur J Endocrinol*. 2008; 159: R1-R4.
- Soriano-Guillén L, Ortega L, Navarro P, et al. Sex-related differences in the association of ghrelin levels with obesity in adolescents. *Clin Chem Lab Med*. 2016; 54: 1371-1376.
- Sorof JM, Lai D, Turner J, et al. Overweight, ethnicity, and the prevalence of hypertension in school-aged children. *Pediatrics*. 2004; 113: 475-482.
- Souza RG, Gomes AC, Naves MM, et al. Nuts and legume seeds for cardiovascular risk reduction: scientific evidence and mechanisms of action. *Nutr Rev*. 2015; 73: 335-347.
- Spalding KL, Arner E, Westermark PO, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008; 453: 783-787.
- Stakos DA, Papaioannou HI, Angelidou I, et al. Plasma leptin and adiponectin concentrations correlate with cardiometabolic risk and systemic inflammation in healthy, non-obese children. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2014; 27: 221-228.
- Steckhan N, Hohmann CD, Kessler C, et al. Effects of different dietary approaches on inflammatory markers in patients with metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition*. 2016; 32: 338-348.
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001; 409: 307-312.
- Suk HJ, Ridker PM, Cook NR, et al. Relation of polymorphism within the C-reactive protein gene and plasma CRP levels. *Atherosclerosis*. 2005; 178: 139-145.
- Suter PM. Carbohydrates and dietary fiber. *Handb Exp Pharmacol*. 2005; 170: 231-261.
- Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, et al. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation*. 2003; 108: 1917-1923.
- Tam CS, Clément K, Baur LA, et al. Obesity and low-grade inflammation: a paediatric perspective. *Obes Rev*. 2010; 11: 118-126.
- Tchernof A, Nolan A, Sites CK, et al. Weight loss reduces C-reactive protein levels in obese postmenopausal women. *Circulation*. 2002; 105: 564-569.
- Teng MS, Hsu LA, Wu S, et al. Association between C-reactive protein gene haplotypes and C-reactive protein levels in Taiwanese: interaction with obesity. *Atherosclerosis*. 2009; 204: e64-e69.

- Tfayli H, Arslanian S. Menstrual health and the metabolic syndrome in adolescents. *Ann N Y Acad Sci.* 2008. 1135: 85-94.
- Tillett WS, Francis T. Serological reactions in pneumonia with a non protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med.* 1930; 52: 561-571.
- Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 2004; 92: 347-355.
- Tuzcu EM, Kapadia SR, Tutar E, et al. High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults. Evidence from intravascular ultrasound. *Circulation.* 2001. 103: 2705-2710.
- Urpi-Sarda M, Casas R, Chiva-Blanch G, et al. Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis. *Pharmacol Res.* 2012; 65: 577-583.
- Valle M, Martos R, Gascón F, et al. Low-grade systemic inflammation, hypoadiponectinemia and a high concentration of leptin are present in very young obese children, and correlate with metabolic syndrome. *Diabetes Metab.* 2005; 31: 55-62.
- Valle Jiménez M, Estepa RM, Camacho RM, et al. Endothelial dysfunction is related to insulin resistance and inflammatory biomarker levels in obese prepubertal children. *Eur J Endocrinol.* 2007; 156: 497-502.
- van Dielen FM, van't Veer C, Schols AM, et al. Increased leptin concentrations correlate with increased concentrations of inflammatory markers in morbidly obese individuals. *Int J Obes.* 2001; 25: 1759-1766.
- van Hall G, Steensberg A, Sacchetti M, et al. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: 3005-3010.
- Viikari LA, Huupponen RK, Viikari JS, et al. Relationship between leptin and C-reactive protein in young Finnish adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92: 4753-4758.
- del Villar-Rubín S, Escorihuela Esteban R, García-Anguita A, et al. [Assessment of overweight from prepuberty to adolescence]. *An Pediatr (Barc).* 2013; 78: 389-392.
- Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, et al. Low-grade systemic inflammation in overweight children. *Pediatrics.* 2001; 107: E13.
- Vitseva OI, Tanriverdi K, Tchkonja TT, et al. Inducible Toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue. *Obesity (Silver Spring).* 2008; 16: 932-937.

- Voudris KV, Chanin J, Feldman DN, et al. Novel Inflammatory Biomarkers in Coronary Artery Disease: Potential Therapeutic Approaches. *Curr Med Chem*. 2015; 22: 2680-2689.
- Vrolix R, Mensink RP. Effects of glycemic load on metabolic risk markers in subjects at increased risk of developing metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr*. 2010; 92: 366-374.
- Wabitsch M. Overweight and obesity in European children: definition and diagnostic procedures, risk factors and consequences for later health outcome. *Eur J Pediatr*. 2000; 159: S8-S13.
- Wang Q, Hunt SC, Xu Q, et al. Association study of CRP gene polymorphisms with serum CRP level and cardiovascular risk in the NHLBI Family Heart Study. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 291: H2752-H2757.
- Wang L, Gaziano JM, Norkus EP, et al. Associations of plasma carotenoids with risk factors and biomarkers related to cardiovascular disease in middle-aged and older women. *Am J Clin Nutr*. 2008; 88: 747-754.
- Wang L, Lu X, Li Y, et al. Functional analysis of the C-reactive protein (CRP) gene -717 A>G polymorphism associated with coronary heart disease. *BMC Med Genet*. 2009; 10: 73.
- Wannamethee SG, Lowe GD, Rumley A, et al. Association of vitamin C status, fruit and vegetable intakes and markers of inflammation and hemostasis. *Am J Clin Nutr*. 2006; 83: 567-574.
- Wärnberg J, Marcos A. Low-grade inflammation and the metabolic syndrome in children and adolescents. *Current Opinion in Lipidology*. 2008; 19: 11-15.
- Weickert MO, Pfeiffer AFH. Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. *J Nutr*. 2008; 138: 439-442.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003; 112: 1796-1808.
- Weisberg SP, Hunter D, Huber R, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J. Clin. Invest*. 2006; 116: 115-124.
- Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003; 112: 1785-1788.
- Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 2005; 115: 1111-1119.
- Welsh P, Polisecki E, Robertson M, et al. Unraveling the directional link between adiposity and inflammation: a bidirectional Mendelian randomization approach. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95: 93-99.

- Whincup PH, Cook DG, Adshead F, et al. Cardiovascular risk factors in British children from towns with widely differing adult cardiovascular mortality. *BMJ*. 1996; 313: 79-84.
- WHO Expert Consultation. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet*. 2004; 363: 157-163.
- Williams DP, Going SB, Lohman TG, et al. Body fatness and risk for elevated blood pressure, total cholesterol and serum-lipoprotein ratios in children and adolescents. *Am J Public Health*. 1992. 82: 358-363.
- Wisse BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15: 2792-2800.
- Wong C, Harris PJ, Ferguson LR. Potential Benefits of Dietary Fibre Intervention in Inflammatory Bowel Disease. *Int J Mol Sci*. 2016; 17.
- Wu DM, Chu NF, Shen MH, et al. Plasma C-reactive protein levels and their relationship to anthropometric and lipid characteristics among children. *J Clin Epidemiol*. 2003; 56: 94-100.
- Wu DM, Chu NF, Shen MH, et al. Obesity, plasma high sensitivity C-reactive protein levels and insulin resistance status among school children in Taiwan. *Clin Biochem*. 2006; 39: 810-815.
- Xu H, Barnes HT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003; 112: 1821-1830.
- Xu L, Li M, Yin J, et al. Change of body composition and adipokines and their relationship with insulin resistance across pubertal development in obese and nonobese chinese children: The BCAMS Study. *Int J Endocrinol*. 2012; 2012: 389108.
- Xu L, Kitade H, Ni Y, et al. Roles of chemokines and chemokine receptors in obesity-associated insulin resistance and non alcoholic fatty liver disease. *Biomolecules*. 2015; 5: 1563-1579.
- Yamagishi S, Nakamura K, Jinnouchi Y, et al. Molecular mechanisms for vascular injury in the metabolic syndrome. *Drugs Exp Clin Res*. 2005; 31: 123-129.
- Yeh ET, Willerson JT. Coming of age of C-reactive protein: using inflammation markers in cardiology. *Circulation*. 2003; 107: 370-371.
- Yeh ET. High-sensitivity C-reactive protein as a risk assessment tool for cardiovascular disease. *Clin Cardiol* 2005; 28: 408-412.
- Yoshida T, Kaneshi T, Shimabukuro T, et al. Serum C-reactive protein and its relation to cardiovascular risk factors and adipocytokines in Japanese children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91: 2133-2137.

- Young I, Rifai N. High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular disease. *Clin Chem*. 2009; 55: 201-202.
- Yoneyama S, Miura K, Sasaki S, et al. Dietary intake of fatty acids and serum C-reactive protein in Japanese. *J Epidemiol*. 2007; 17: 86-92.
- Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, et al. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 972-978.
- Zampelas A, Panagiotakos DB, Pitsavos C, et al. Fish consumption among healthy adults is associated with decreased levels of inflammatory markers related to cardiovascular disease: the ATTICA study. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46: 120-124.
- Zang YY, Gottardo L, Mlynarski W, et al. Genetic variability at the leptin receptor (LEPR) locus is a determinant of plasma fibrinogen and C-reactive protein levels. *Atherosclerosis*. 2007; 191: 121-127.
- Zee RY, Ridker PM. Polymorphism in the human C-reactive protein (CRP) gene, plasma concentrations of CRP, and the risk of future arterial thrombosis. *Atherosclerosis*. 2002; 162: 217-219.
- Zhao Y, Wang H, Liu S, et al. Association study of CRP gene polymorphism and hypertension in Han Chinese population. *Gene*. 2013; 512: 41-46.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994; 372: 425-432.
- Zhang YY, Gottardo L, Mlynarski W, et al. Genetic variability at the leptin receptor (LEPR) locus is a determinant of plasma fibrinogen and C-reactive protein levels. *Atherosclerosis*. 2007; 191: 121-127.

ANEXOS

Publicaciones

Artículos derivados de esta tesis:

Navarro P, de Dios O, Gavela-Pérez T, Jois A, Garcés C, Soriano-Guillén L. **High-sensitivity C-reactive protein and leptin levels related to Body Mass Index changes through childhood.** *The Journal of Pediatrics* 2016; 178: 178-182. Q1 1^{er} decil

Navarro P, de Dios O, Jois A, Gavela-Pérez T, Gorgojo I, Martín-Moreno J, Soriano-Guillén L, Garcés C. **Vegetable and fruit intake and high-sensitivity C-reactive protein levels in pre-pubertal girls.** *Nutrients* 2017; doi:10.3390/nu9030224. Q1

Navarro P, de Dios O, Soriano-Guillén L, Garcés C. **Relationship between polymorphisms in the CRP, LEP and LEPR genes and high sensitivity C-reactive protein levels in Spanish children.** *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2017 (en prensa) Q1

Otros trabajos publicados durante el desarrollo de esta tesis:

Ortega L, Riestra P, **Navarro P**, Gavela-Pérez T, Soriano-Guillén L, Garcés C. Resistin levels are related to fat mass, but not to body mass index in children. **Peptides** 2013; 49: 49-52.

Ortega L, **Navarro P**, Riestra P, Gavela-Pérez T, Soriano-Guillén L, Garcés C. Association of resistin polymorphisms with resistin levels and lipid profile in children. **Molecular Biology Reports** 2014; 41: 7659-7664.

Gavela-Pérez T, Garcés C, **Navarro P**, López Villanueva L, Soriano-Guillén L. Earlier menarcheal age in Spanish girls is related with an increase in body mass index between pre-pubertal school age and adolescence. **Pediatric Obesity** 2015; 10: 410-415.

Jois A, **Navarro P**, Ortega-Senovilla H, Gavela-Pérez T, Soriano-Guillén L y Garcés C. Relationship of high leptin levels with an adverse lipid and insulin profile in 6-8 year-old children in Spain. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease** 2015; 25: 1111-1116.

Soriano-Guillén L, Ortega L, **Navarro P**, Riestra P, Gavela-Pérez T, Garcés C. Sex-related differences in the association of ghrelin levels with obesity in children. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine** 2015; 54: 1371-1376.

Gavela-Pérez T, **Navarro P**, Soriano-Guillén L, Garcés C. High prepubertal leptin levels are associated with earlier menarcheal age. **The Journal of Adolescent Health** 2016; 59: 177-181.

Comunicaciones presentadas en congresos:

I Congreso Interdisciplinar en Genética Humana. Madrid, España 2017. Relación de polimorfismos de los genes de la proteína C-reactiva (PCR), leptina y receptor de la leptina con los niveles de PCR en niños españoles. **Pilar Navarro**, Olaya de Dios, Elisa castillo, Leandro Soriano-Guillén, Carmen Garcés. Laboratorio de lípidos, IIS-FJD.

83rd Congress European of Society European of Atherosclerosis. Glasgow, UK 2015. Relationship of leptin with lipid profile and insulin levels in 6-8 year-old children in Spain. Asha Jois, **Pilar Navarro**, Carmen Garcés. Lipid Research Laboratory, IIS-FJD.

XXVII Congreso de la Sociedad Española de Arterioesclerosis. Barcelona, España 2014. Diferente asociación del polimorfismo CETP TaqIB con niveles plasmáticos de colesterol HDL-C y Apo AI dependiendo de la edad de los niños. **Pilar Navarro**, Lorena Ortega, Laura Lopez, Miguel A Lasuncion, Carmen Garcés. Laboratorio de lípidos, IIS-FJD.

XXVII Congreso de la Sociedad Española de Arterioesclerosis. Barcelona, España 2014. Niveles de resistina estan relacionados con masa grasa, pero no con IMC en niños. Lorena Ortega, **Pilar Navarro**, Teresa Gavela-Pérez, Leandro Soriano-Guillén, Carmen Garcés. Laboratorio de lípidos, IIS-FJD.



High-Sensitivity C-Reactive Protein and Leptin Levels Related to Body Mass Index Changes Throughout Childhood

Pilar Navarro, MS¹, Olaya de Dios, MS¹, Teresa Gavela-Pérez, PhD^{1,2}, Asha Jois, MD^{1,*}, Carmen Garcés, PhD¹, and Leandro Soriano-Guillén, PhD^{1,2}

Objectives To analyze the association between high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) levels and cardiovascular risk factors in healthy school children, and to evaluate whether changes in body mass index (BMI) category throughout childhood affect hs-CRP levels.

Study design We measured serum hs-CRP levels, lipid profile, insulin levels, and leptin levels in 683 prepubertal children and 748 adolescents. A total of 272 children participated in the study in both cohorts, prepubertal (baseline; age 6-8 years) and adolescents (follow-up; age 12-16 years).

Results Compared with their normal weight (NW) counterparts, hs-CRP levels were significantly higher in obese and overweight (OW) adolescents and obese prepubertal children. The highest hs-CRP levels were seen in children who were OW at baseline and at follow-up, and the lowest levels in those who transitioned from OW at baseline to NW at follow-up. High-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-I levels decreased across the hs-CRP tertile in both prepubertal children and adolescents, with significant differences ($P < .001$) in concentrations between the highest and lowest tertiles in 6- to 8-year-old boys and girls and in 12- to 16-year-old boys. The hs-CRP levels were also significantly associated with leptin levels in both prepubertal children and adolescents, with a significant increase across hs-CRP tertiles ($P < .001$).

Conclusions The shift from OW to NW throughout childhood is associated with a decrease in hs-CRP level to below that observed in children who maintain NW throughout childhood. Leptin levels were strongly associated with hs-CRP levels in our population independent of BMI. Our findings suggest that an obesity-related chronic inflammatory state may be reversible by improving weight status. (*J Pediatr* 2016;178:178-82).

Increased adipose tissue in obesity is implicated in the development of a systemic, low-grade inflammatory state that is associated with the early stages of atherogenesis.^{1,2} C-reactive protein (CRP) is a marker of inflammation that has been shown to activate all stages of atherosclerosis.^{3,4} Adipocytokines derived from adipose tissue stimulate hepatic inflammation, inducing the production of CRP, which acts as a marker of nonspecific systemic inflammation.^{4,5} When measured by high-sensitivity assays, high-sensitivity CRP (hs-CRP) has been shown to be a predictor of cardiovascular risk.⁴ It is accepted that pathological processes related to the development of arteriosclerosis begin in early life^{6,7}; thus, hs-CRP may be a potential biomarker for the early detection of subjects at risk.

In adults, CRP has been associated with obesity^{8,9} and such cardiovascular risk factors as hypertriglyceridemia, low high-density lipoprotein (HDL) cholesterol level, and insulin resistance.^{8,10-12} In children, higher CRP levels have been significantly associated with obesity and obesity-related comorbidities.^{9,13-18} Findings from the National Health and Nutrition Examination Survey identified body mass index (BMI) as the best predictor of CRP levels in children aged 3-17 years.¹⁹ In addition, intervention studies have shown that loss of body weight loss is associated with lower CRP levels.²⁰

Leptin plays an important role in the development of obesity and obesity-related complications.²¹ Several studies have shown a positive correlation between CRP and leptin levels²²; however, the association has not been investigated in nonobese children.

Considering these findings, we hypothesized that the maintenance of a high BMI over time in children may affect CRP levels. To test this hypothesis, we aimed to analyze the association of hs-CRP levels with overweight (OW) and obesity in children, and to evaluate how changes in BMI from the prepubertal stage to adolescence could affect hs-CRP levels. We also aimed to assess the associations with lipid, insulin, and leptin levels.

Apo	Apolipoprotein
BMI	Body mass index
CRP	C-reactive protein
HDL	High-density lipoprotein
hs-CRP	High-sensitivity C-reactive protein
IL-6	Interleukin 6
NW	Normal weight
OW	Overweight

From the ¹Lipid Research Laboratory and ²Department of Pediatrics, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

*Current address: Faculty of Medicine, Nursing, and Health Sciences, Monash University, Victoria, Australia.

Supported by Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 14/00344) and Biobank (FEDER RD09/0076/00101). P.N. is a fellow of the Conchita Rabago Foundation. The authors declare no conflicts of interest.

0022-3476/\$ - see front matter. © 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.08.020>

Methods

We included 2 population-based samples of 683 prepubertal children (326 boys and 357 girls) and 748 adolescents (350 boys and 398 girls). The subjects were participants in a cross-sectional study designed to analyze cardiovascular risk factors in Spanish schoolchildren. A total of 272 children were examined both at study baseline at age 6-8 years and at follow-up at age 12-16 years. At baseline, children were selected by means of random cluster sampling in schools. Sampling was carried out in 2 stages: first, schools were selected from lists made available by the Regional Educational Authorities; and second, classrooms and pupils were selected. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Clinical Investigation of the Fundación Jiménez Díaz. The investigation was performed in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki and subsequent reviews, as well as the prevailing Spanish legislation on clinical research in human subjects. All parents gave written consent for their child's inclusion in the study. All children with a parent-reported chronic disease were excluded.

Measurements (weight and height) were obtained with the children barefoot and wearing light clothing. BMI (weight in kilograms divided by height in meters squared; kg/m^2) was calculated. Children in both age cohorts were considered OW or obese if the BMI exceeded the age-specific cutoff points proposed for children by Cole et al.²³

Blood samples were obtained early in the morning after a 12-hour fasting period. Total cholesterol and triglycerides (TG) were determined enzymatically with a Technicon RA-1000 Autoanalyzer (Technicon, Dublin, Ireland). HDL cholesterol was measured after precipitation of apolipoprotein (apo) B-containing lipoproteins with phosphotungstic acid and Mg (Roche Diagnostics, Madrid, Spain). Low-density lipoprotein cholesterol was calculated according to the Friedewald formula. Plasma apo A-I and apo B concentrations were measured by immunonephelometry (Dade Berhing, Frankfurt, Germany). Plasma leptin levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay using a commercially available kit (Leptin EIA-2395; DRG Instruments, Marburg, Germany). Serum insulin concentrations were measured by radioimmunoassay using a commercial kit (BI-Insulin IRMA; Bio-Rad, France). CRP levels were measured using an hs-CRP enzyme-linked immunosorbent assay kit (SK00080-02; Aviscera Bioscience, Santa Clara, California). The hs-CRP levels were measured with a detection limit of 0.15 mg/L. Levels below this detection limit were set to 0.15 mg/L before analysis.

Statistical Analyses

Statistical analysis was performed using SPSS version 15.0 (SPSS, Chicago, Illinois). The Kolmogorov-Smirnov test was used to analyze whether the variables under study were normally distributed. When possible, variables that were not normally distributed were log-transformed before analysis. Children with an hs-CRP level ≥ 10 mg/L were excluded from the study to avoid the influence of acute infection. The Kruskal-Wallis test was used to compare means of hs-CRP between groups

depending on weight category and on weight category change though childhood. ANOVA and the Tukey or Games-Howell post hoc test were used to compare means of biochemical variables by hs-CRP tertiles. Spearman correlation analysis was performed to evaluate the association between changes in BMI z-scores and hs-CRP levels in adolescents. Univariate ANOVAs were performed to analyze the associations between hs-CRP levels and leptin, HDL cholesterol, and apo-AI levels by age group and sex after adjusting for BMI. Finally, regression analyses were performed, with hs-CRP levels in adolescents as the dependent variable and leptin and lipid levels as independent variables.

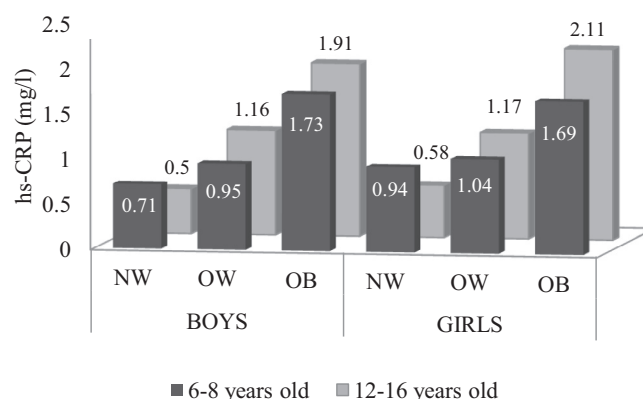
Results

The average age of children at baseline was 7.2 ± 0.6 years, with no significant difference between the sexes. At follow-up, the average age was 14.6 ± 0.8 years.

Values of hs-CRP were below or equal to the detection limit in 33% of the 6- to 8-year-old children and in 26% of the 12- to 16-year-old children. The hs-CRP levels increased gradually across BMI categories in the 12- to 16-year-old boys and girls (Figure). Obese prepubertal children had higher hs-CRP levels than their normal-weight (NW) and OW counterparts (Figure). A significant positive correlation (0.159 ; $P = .006$) was found between BMI z-score variations and hs-CRP levels in adolescents.

To further analyze the relationship between hs-CRP and changes in weight category between baseline and follow-up, we classified the children into 4 groups: children who were NW at baseline and remained NW at follow-up (NW-NW), children who were NW at baseline and OW (including OW and obese children) at follow-up (NW-OW), children who were OW at baseline and NW at follow-up (OW-NW), and children who were OW at both ages (OW-OW). The mean hs-CRP level in each group is shown in Table I. The hs-CRP levels ($P < .05$) were significantly higher in boys in the OW-OW group than in boys in the NW-NW group and the OW-NW group. The lowest hs-CRP levels were seen in boys and girls who transitioned from OW to NW between early school age and adolescence, although the difference did not reach statistical significance (Table I).

To analyze their association with hs-CRP levels, we compared lipid, insulin, and leptin levels by hs-CRP tertile based on age and sex (Table II). A decrease in HDL cholesterol and apo-AI levels across hs-CRP tertiles was observed at both ages. HDL cholesterol and apo-AI levels were significantly lower in the 6- to 8-year-old children and in the 12- to 16-year-old boys in the highest hs-CRP tertile compared with those in the lowest hs-CRP tertile. A significant progressive increase ($P < .001$) in leptin levels across hs-CRP tertiles was observed at both ages. No significant association was found between insulin and hs-CRP levels. On univariate ANOVA, after adjusting for BMI, the associations between hs-CRP and leptin, HDL cholesterol, and apo-AI levels remained significant in boys in both age groups, as well as in 6- to 8-year-old girls. The associations also remain similar when children below the hs-CRP



	6-8-year-old children (n = 683)				12-16-year-old children (n = 748)			
	NW (69%)	OW (18%)	OB (13%)	p*	NW (71%)	OW (23%)	OB (6%)	p*
Boys	0.71±1.3	0.95±1.7	1.73±2.2	<0.001	0.50±0.7	1.16±1.4	1.91±1.7	<0.001
Girls	0.94±1.8	1.04±1.4	1.69±2.0	<0.001	0.58±1.0	1.17±2.0	2.11±2.0	<0.001

Value are mean±standard deviation NW: normal weight; OW: overweight; OB: obese

Figure. Plasma hs-CRP levels (mg/L) in prepubertal children and adolescents according to weight category. Values are mean ± SD. *P values by the Kruskal-Wallis test.

detection limit were excluded. Evaluation of correlations between changes in BMI z-score and biochemical variables between baseline at the follow-up and hs-CRP levels in adolescents revealed significant positive correlations between hs-CRP levels and changes in BMI z-score and leptin levels, and significant negative correlations between hs-CRP levels and variations in HDL cholesterol levels in boys and apo AI levels in both sexes. Stepwise regression analyses performed with hs-CRP levels in adolescents as the dependent variable, after adjustment for changes in BMI z-score, showed that changes in leptin between levels at baseline and follow-up were significantly related to hs-CRP levels, accounting for 16% of the variance in boys and 6% of the variance in girls. Changes in HDL cholesterol levels were significantly associated with hs-CRP levels in boys, accounting for 5% of the variance.

Table I. Relationship of changes in weight category between prepubertal age and adolescence with hs-CRP levels in adolescents

Category	Boys		Girls	
	n	Mean (95% CI)	n	Mean (95% CI)
NW-NW	76	0.59 (0.40-0.79)	91	0.77 (0.49-1.05)
NW-OW	15	0.89 (0.37-1.40)	9	0.89 (0.05-1.74)
OW-NW	9	0.47 (0.08-0.86)	27	0.55 (0.32-0.79)
OW-OW	23	1.63 (0.96-2.31)	22	1.25 (0.34-2.16)

Discussion

Evidence from numerous studies has clearly demonstrated the association between obesity and increased CRP levels in adults and children.^{9,13-16} Furthermore, intervention studies that aimed to analyze how variation in weight may affect CRP levels have shown that a decrease in BMI is associated with lowered CRP levels.^{20,24} We observed the lowest hs-CRP levels in boys who transitioned from OW to NW between early school age and adolescence. As expected, children who remained OW throughout childhood had the highest hs-CRP levels. These levels were almost double in OW adolescents who were OW at baseline compared with OW adolescents who were NW at baseline.

CRP is synthesized mainly in the liver, and adipose tissue-released cytokines, such as interleukin 6 (IL-6), are known to trigger the hepatic synthesis of CRP.²⁵ However, it has been hypothesized that adipose tissue may be an additional source of CRP,³ and CRP mRNA expression in human adipose tissue has been confirmed.²⁶⁻²⁸ This may explain the association between CRP levels and obesity, as well as the evolution in weight category and circulating CRP levels observed in our study. Unfortunately, the nature of our study prevents us from clarifying the existence of CRP secretion from fat tissue.

Parallel to its association with obesity, hs-CRP has been associated with various cardiovascular risk factors.^{8,10-12,14-17} In our study, we identified a relationship between hs-CRP and HDL metabolism, observing a significant inverse correlation between hs-CRP levels and HDL cholesterol and apo A-I levels. Previous

Table II. Lipid, insulin, and leptin levels in prepubertal children and adolescents by hs-CRP tertile

Variable	Prepubertal boys (n = 326)				Prepubertal girls (n = 357)			
	1: ≤0.15 mg/L	2: 0.16-0.53 mg/L	3: ≥0.54 mg/L	P value	1: ≤0.15 mg/L	2: 0.16-0.63 mg/L	3: ≥0.64 mg/L	P value
Total cholesterol, mg/dL	186.5 ± 25.8	183.1 ± 33.1	181.5 ± 22.8	NS	183.7 ± 28.6	182.1 ± 29.5	184.5 ± 29.6	NS
Triglycerides, mg/dL	66.1 ± 18.5	74.8 ± 38.7	72.9 ± 26.2	NS	68.4 ± 23.9	72.8 ± 25.8	76.1 ± 21.6	NS
HDL cholesterol, mg/dL	62.9 ± 12.2	58.5 ± 12.9	55.9 ± 13.3	<.001	61.2 ± 11.8	59.2 ± 13.1	55.0 ± 14.8	<.01
				1-2*, 1-3†				1-3*
LDL cholesterol, mg/dL	110.4 ± 24.9	109.6 ± 33.8	110.9 ± 21.8	NS	108.8 ± 26.6	108.4 ± 26.8	114.3 ± 27.1	NS
apo A-I, mg/dL	140.9 ± 17.1	135.3 ± 19.1	130.6 ± 17.8	<.001	136.6 ± 17.8	134.3 ± 16.7	129.8 ± 19.0	<.05
				1-3†				1-3*
apo B, mg/dL	69.9 ± 13.1	70.9 ± 16.6	69.9 ± 13.5	NS	72.7 ± 2.3	69.1 ± 2.2	73.4 ± 2.0	NS
Insulin, mIU/mL	3.4 ± 1.9	3.6 ± 2.8	4.2 ± 2.7	NS	3.3 ± 2.1	4.0 ± 3.3	4.2 ± 3.2	.05
								1-3*
Leptin, ng/mL	3.7 ± 4.5	5.2 ± 5.7	9.5 ± 10.1	<.001	6.8 ± 7.9	9.5 ± 8.6	12.4 ± 12.1	<.01
				1-3†				1-3*
Variable	Adolescent boys (n = 350)				Adolescent girls (n = 398)			
	1: ≤0.17 mg/L	2: 0.18-0.63 mg/L	3: ≥0.64 mg/L	P value	1: ≤0.15 mg/L	2: 0.16-0.46 mg/L	3: ≥0.47 mg/L	P value
Total cholesterol, mg/dL	161.6 ± 27.3	160.9 ± 28.1	163.8 ± 26.9	NS	172.3 ± 32.2	172.5 ± 27.4	169.2 ± 28.0	NS
Triglycerides, mg/dL	76.1 ± 35.4	75.9 ± 30.8	84.5 ± 39.3	NS	72.6 ± 21.0	75.02 ± 27.37	78.4 ± 32.8	NS
HDL cholesterol, mg/dL	53.7 ± 14.7	50.8 ± 15.9	46.8 ± 11.6	<.01	55.8 ± 13.6	55.73 ± 14.25	53.5 ± 14.9	NS
				1-3*				
LDL cholesterol, mg/dL	92.8 ± 24.9	94.8 ± 24.4	100.2 ± 24.3	NS	101.8 ± 29.0	101.55 ± 27.45	100.0 ± 24.9	NS
apo A-I, mg/dL	148.2 ± 21.6	149.5 ± 30.9	137.8 ± 24.1	<.01	149.2 ± 24.6	151.9 ± 25.7	145.1 ± 23.8	.083
				1-3*				
apo B, mg/dL	67.8 ± 15.9	68.2 ± 14.7	73.5 ± 16.2	NS	71.4 ± 18.2	69.6 ± 15.3	71.7 ± 14.7	NS
Insulin, mIU/mL	7.9 ± 3.9	10.23 ± 11.0	8.8 ± 4.9	NS	8.2 ± 4.3	8.9 ± 4.8	8.6 ± 5.2	NS
Leptin, ng/mL	3.3 ± 4.6	6.1 ± 7.9	10.1 ± 9.9	<.001	14.2 ± 7.8	16.5 ± 10.0	19.2 ± 12.1	<.05
				1-2†; 1-3†; 2-3*				1-3*

LDL, low-density lipoprotein; NS, not significant.

Values are expressed as mean ± SD.

*P < .05.

†P < .001, ANOVA with the Tukey or Games-Howell post hoc test.

studies in adults¹⁰⁻¹² and children^{14-18,29,30} also have found an association between hs-CRP and HDL cholesterol levels. Studies in the literature examining the relationship between hs-CRP and apolipoprotein levels, all of which have been in children of Asian descent, have produced conflicting results.^{17,29,31} IL-6, a proinflammatory cytokine released from adipose tissue, has been linked to CRP levels. Alterations in IL-6 levels could be responsible for the metabolic effect observed on HDL metabolism, given that IL-6 affects the action of lipoprotein lipase and stimulates lipolysis.^{32,33}

The association between hs-CRP and HDL cholesterol levels was similar in prepubertal boys and girls, but different between the sexes in adolescents. The absence of a sex difference in the association in prepubertal children could indicate an age-related hormonal influence. Juanola et al have described different correlations between hs-CRP levels and HDL cholesterol in adults than in children.³⁴ In their study, CRP levels were associated with HDL cholesterol in 12- to 18-year-olds, but not in adults.³⁴ A positive association with triglyceride levels has been reported in some studies,^{16,30,31} but was not observed in our study or in other studies in children.^{14,19,34}

Leptin plays an important role in the development of obesity-related complications,²¹ possibly acting as link between inflammation and metabolism in obesity-related disorders.³⁵ Leptin has been reported to regulate proinflammatory immune responses.³⁶ An important association between hs-CRP and

leptin levels was observed in both age groups in our study. The association has been confirmed in several studies in adults.²² An association similar to that reported here has been described in nonobese³⁷ and obese children.³⁸ It seems that high leptin levels could promote the synthesis and secretion of CRP³⁶; however, further studies are needed to elucidate the role of leptin in the low-grade inflammation observed in obese children through its influence on CRP synthesis.

One limitation of our present study is that the lower limit of detection for hs-CRP was set at 0.15 mg/L, creating difficulties in statistical analysis. Another key limitation is the lack of information regarding fat mass and waist circumference, which would have allowed us to examine whether abdominal obesity is associated with CRP in a similar manner to BMI. An additional important limitation is the omission of pubertal stage assessment, preventing us from using Tanner stage as a covariate in our analysis.

In conclusion, changes in weight category between prepubertal and adolescent children strongly influence CRP values, indicating that the chronic inflammatory state associated with obesity may be reversible. This finding has important implications for clinical practice by strengthening the evidence surrounding the importance of improving weight status in childhood. Our results also show a significant association between leptin levels and hs-CRP concentrations, independent of BMI. ■

Submitted for publication May 10, 2016; last revision received Jul 12, 2016; accepted Aug 4, 2016

Reprint requests: Carmen Garcés, PhD, Lipid Research Laboratory, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Av Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain. E-mail: cgarcés@fjd.es

References

- Kapoti S, Holzer G, Schaller G, Haumer M, Widhalm H, Weghuber D, et al. A proinflammatory state is detectable in obese children and is accompanied by functional and morphological vascular changes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2541-6.
- Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 2005;96:939-49.
- Lau DC, Dhillon B, Yan H, Szmítok PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H2031-41.
- Yeh ET. High-sensitivity C-reactive protein as a risk assessment tool for cardiovascular disease. *Clin Cardiol* 2005;28:408-12.
- Brooks GC, Blaha MJ, Blumenthal RS. Relation of C-reactive protein to abdominal adiposity. *Am J Cardiol* 2010;106:56-61.
- Berenson GS, Wattigney WA, Tracy RE, Newman WP 3rd, Srinivasan SR, Webber LS, et al. Atherosclerosis of the aorta and coronary arteries and cardiovascular risk factors in persons aged 6 to 30 years and studied at necropsy (The Bogalusa Heart Study). *Am J Cardiol* 1992;70:851-8.
- Tuzcu EM, Kapadia SR, Tutar E, Ziada KM, Hobbs RE, McCarthy PM, et al. High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. *Circulation* 2001;103:2705-10.
- Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14,719 initially healthy American women. *Circulation* 2003;107:391-7.
- Choi J, Joseph L, Pilote L. Obesity and C-reactive protein in various populations: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 2013;14:232-44.
- Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:972-8.
- Piché ME, Lemieux S, Weisnagel SJ, Corneau L, Nadeau A, Bergeron J. Relation of high-sensitivity C-reactive protein, interleukin-6, tumor necrosis factor- α , and fibrinogen to abdominal adipose tissue, blood pressure, and cholesterol and triglyceride levels in healthy postmenopausal women. *Am J Cardiol* 2005;96:92-7.
- Al-Hamodi Z, Al-Habori M, Al-Meerri A, Saif-Ali R. Association of adipokines, leptin/adiponectin ratio and C-reactive protein with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr* 2014;6:99.
- Tam CS, Clément K, Baur LA, Tordjman J. Obesity and low-grade inflammation: a paediatric perspective. *Obes Rev* 2010;11:118-26.
- Nappo A, Iacoviello L, Fraterman A, Gonzalez-Gil EM, Hadjigeorgiou C, Marild S, et al. High-sensitivity C-reactive protein is a predictive factor of adiposity in children: results of the identification and prevention of dietary- and lifestyle-induced health effects in children and infants (IDEFICS) study. *J Am Heart Assoc* 2013;2:e000101.
- Cook DG, Mendall MA, Whincup PH, Carey IM, Ballam L, Morris JE, et al. C-reactive protein concentration in children: relationship to adiposity and other cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* 2000;149:139-50.
- Oliveira AC, Oliveira AM, Adan LF, Oliveira NF, Silva AM, Ladeia AM. C-reactive protein and metabolic syndrome in youth: a strong relationship? *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:1094-8.
- Yoshida T, Kaneshi T, Shimabukuro T, Sunagawa M, Ohta T. Serum C-reactive protein and its relation to cardiovascular risk factors and adipocytokines in Japanese children. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2133-7.
- Chang CJ, Jian DY, Lin MW, Zhao JZ, Ho LT, Juan CC. Evidence in obese children: contribution of hyperlipidemia, obesity-inflammation, and insulin sensitivity. *PLoS ONE* 2015;10:e0125935.
- Ford ES. C-reactive protein concentration and cardiovascular disease risk factors in children: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. *Circulation* 2003;108:1053-8.
- Reinehr T, Stoffel-Wagner B, Roth CL, Andler W. High-sensitive C-reactive protein, tumor necrosis factor α , and cardiovascular risk factors before and after weight loss in obese children. *Metabolism* 2005;54:1155-61.
- Ren J. Leptin and hyperleptinemia - from friend to foe for cardiovascular function. *J Endocrinol* 2004;181:1-10.
- Hribal ML, Fiorentino TV, Sesti G. Role of C reactive protein (CRP) in leptin resistance. *Curr Pharm Des* 2014;20:609-15.
- Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 2000;320:1240-3.
- Tchernof A, Nolan A, Sites CK, Ades PA, Poehlman ET. Weight loss reduces C-reactive protein levels in obese postmenopausal women. *Circulation* 2002;105:564-9.
- Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990;265:621-36.
- Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nishida M, Kumada M, et al. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation* 2003;107:671-4.
- Anty R, Bekri S, Luciani N, Saint-Paul MC, Dahman M, Iannelli A, et al. The inflammatory C-reactive protein is increased in both liver and adipose tissue in severely obese patients independently from metabolic syndrome, Type 2 diabetes, and NASH. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1824-33.
- Memoli B, Procino A, Calabró P, Esposito P, Grandaliano G, Pertosa G, et al. Inflammation may modulate IL-6 and C-reactive protein gene expression in the adipose tissue: the role of IL-6 cell membrane receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293:E1030-5.
- Hiura M, Kikuchi T, Nagasaki K, Uchiyama M. Elevation of serum C-reactive protein levels is associated with obesity in boys. *Hypertens Res* 2003;26:541-6.
- Soriano-Guillén L, Hernández-García B, Pita J, Domínguez-Garrido N, Del Río-Camacho G, Rovira A. High-sensitivity C-reactive protein is a good marker of cardiovascular risk in obese children and adolescents. *Eur J Endocrinol* 2008;159:R1-4.
- Roh EJ, Lim JW, Ko KO, Cheon EJ. A useful predictor of early atherosclerosis in obese children: serum high-sensitivity C-reactive protein. *J Korean Med Sci* 2007;22:192-7.
- Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh J, Calvo JC, Scow RO, Jablons D. Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer Res* 1992;52:4113-6.
- van Hall G, Steensberg A, Sacchetti M, Fischer C, Keller C, Schjerling P, et al. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3005-10.
- Juonala M, Viikari JS, Rönkämaa T, Taittonen L, Marniemi J, Raitakari OT. Childhood C-reactive protein in predicting CRP and carotid intima-media thickness in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1883-8.
- Martin SS, Qasim A, Reilly MP. Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1201-10.
- Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 1998;12:57-65.
- Stakos DA, Papaioannou HI, Angelidou I, Mantadakis E, Paraskakis E, Tsigalou C, et al. Plasma leptin and adiponectin concentrations correlate with cardiometabolic risk and systemic inflammation in healthy, non-obese children. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2014;27:221-8.
- Pires A, Martins P, Pereira AM, Marinho J, Vaz Silva P, Marques M, et al. Pro-inflammatory triggers in childhood obesity: correlation between leptin, adiponectin and high-sensitivity C-reactive protein in a group of obese Portuguese children. *Rev Port Cardiol* 2014;33:691-7.

Article

Vegetable and Fruit Intakes Are Associated with hs-CRP Levels in Pre-Pubertal Girls

Pilar Navarro ^{1,†}, Olaya de Dios ^{1,†}, Asha Jois ^{1,‡}, Teresa Gavela-Pérez ^{1,2}, Lydia Gorgojo ³, José M. Martín-Moreno ³, Leandro Soriano-Guillen ^{1,2} and Carmen Garcés ^{1,*}

¹ Lipid Laboratory, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, 28040 Madrid, Spain; pilar.nsanchez@quironsalud.es (P.N.); olaya.dios@quironsalud.es (O.d.D.); ashamaya08@gmail.com (A.J.); TGavela@fjd.es (T.G.-P.); LSoriano@fjd.es (L.S.-G.)

² Department of Pediatrics, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, 28040 Madrid, Spain

³ Department of Preventive Medicine and Public Health and INCLIVA-Clinical Hospital, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain; lydia.gorgojo@gmail.com (L.G.); dr.martinmoreno@gmail.com (J.M.M.-M.)

* Correspondence: cgarcés@fjd.es; Tel.: +34-91-5432880

† The first two authors contributed equally to this work.

‡ Permanent address: Faculty of Medicine, Nursing and Health Sciences, Monash University, Melbourne 3800, Australia.

Received: 2 December 2016; Accepted: 27 February 2017; Published: 2 March 2017

Abstract: The influence of diet on inflammation in children remains unclear. We aimed to analyze the influence of diet on high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) levels in a pre-pubertal population free of other influences that may affect hs-CRP levels. We determined hs-CRP levels in 571 six- to eight-year-old children using an hs-CRP ELISA kit. Information on food and nutrient intake was obtained through a food-frequency questionnaire. Overall dietary quality was assessed using the Healthy Eating Index (HEI). We found that girls in the highest tertile of hs-CRP levels had a higher intake of saturated fatty acid, and lower intakes of fiber and vitamin E and a lower HEI score when compared to those in tertiles 1 and 2. We also observed a significant decrease in fruit and vegetable intakes by hs-CRP tertile. Factor analysis showed that a dietary pattern that was loaded most strongly with vegetable, fruit, fiber and vitamin A and E intakes correlated negatively (-0.132 , $p < 0.05$) with hs-CRP. No such association was found in boys. In conclusion, our data show that girls with a poorer quality diet show higher hs-CRP levels already at a pre-pubertal age.

Keywords: hs-CRP levels; pre-pubertal children; fibre intake; vegetable intake; fruit intake; antioxidants

1. Introduction

Obesity is associated with dysregulation of adipocytokine release, resulting in an increase in the secretion of a number of inflammatory factors that have been associated with an increased cardiovascular risk profile, even in early life [1]. C-reactive protein (CRP) is an acute-phase protein that has been consistently associated with obesity. This is thought to be due to the stimulation of hepatic inflammation by the release of adipocytokines, thereby inducing the production of CRP [2].

It is accepted that pathological processes related to the development of arteriosclerosis, which leads to an increased cardiovascular risk, begin in early life [3,4] and are related to the presence of cardiovascular risk factors at this age. CRP is an inflammatory marker that is considered to activate all stages of atherosclerosis [5].

Diet composition is related to inflammatory status [6]. Several studies suggest an association between diet and CRP levels [7,8]. Oxidative stress has pro-inflammatory effects, and CRP has

an important role in this pathway [9], and antioxidant vitamins have been inversely related to CRP concentrations [10,11]. As vegetables and fruits are a major source of antioxidant vitamins, their association with CRP levels has been extensively studied. A number of studies suggest that a high consumption of vegetables and fruits is related to lower levels of CRP [10,12,13]. Studies in children, including the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) [14] and the Identification and prevention of Dietary- and lifestyle-induced health EFfects In Children and infantS (IDEFICS) Study in European children [15], have also reported a significant inverse association between a high intake of vegetables and the inflammatory status of the children, particularly CRP levels.

Vegetables and fruit also have high fiber content, and therefore multiple studies have analyzed the potential influence of fiber on plasma CRP levels in adults [16]. Even though epidemiologic studies reported an inverse association between the intake of fiber and levels of hs-CRP [16], a review of the evidence from intervention studies does not support the anti-inflammatory benefits of increasing fiber intake [16].

The relationship between hs-CRP and dietary patterns has also been investigated [17,18]. Dietary patterns poor in vegetable intake and omega-3 fatty acid intake, and high in refined carbohydrates and saturated and trans fatty acids have been associated with high levels of pro-inflammatory molecules in adults [7,17]. The association of plasma CRP levels with a Mediterranean dietary pattern has been largely investigated, and shows a significant association of these patterns with CRP levels [19,20]. However, to our knowledge, no studies analyzing these patterns have been conducted in children.

In our study we aimed to investigate whether dietary factors are associated with hs-CRP levels in a large, well-defined, population-based sample of pre-pubertal children. We have analyzed the hypothesis that a healthy dietary pattern could be associated with lower hs-CRP levels in children.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

Our study included a population-based sample of 571 six- to eight-year-old children (301 girls and 270 boys). Subjects were participants in a cross-sectional study designed to analyze cardiovascular risk factors in Spanish schoolchildren, the Four Provinces Study. Data was gathered cross-sectionally from representative samples of children (age range, six to eight years) in the four cities participating in the study. Children were selected through random cluster-sampling of schools, stratified by sex and socio-economic level (i.e., public versus private schools). Dietary information was gathered on a total of 1,112 children, comprising 557 (50.1%) boys and 555 (49.9%) girls. The overall response rate was 85%, with a similar rate in all four cities [21]. In this study, the population comprises 571 of those children with diet information in whom hs-CRP levels could be measured.

Parents were required to sign a written consent form allowing their children to participate. All children reported by their parents to be suffering from metabolic, endocrine, liver or kidney disorders were excluded from the study. Ten children with hs-CRP levels equal or above 10 mg/L were excluded to avoid the influence of acute infection. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Clinical Investigation of the Fundación Jiménez Díaz (approval code PI11/00344). The investigation fulfils the principles contained in the Declaration of Helsinki and subsequent reviews, as well as the prevailing Spanish legislation on clinical research in human subjects.

2.2. Data Collection

The same team consisting of one physician and several nurses was in charge of blood extractions and physical measurements (weight and height).

2.3. Anthropometric Variables

Measurements (weight and height) were taken with fasting children barefoot and wearing light clothing. Height was measured to the last millimetre using a portable stadiometer, and weight was

measured to the last 0.1 kg using a standardized electronic digital scale. Body mass index (BMI) (weight in kilograms divided by height in meters squared, kg/m^2) was calculated from these parameters.

2.4. Biochemical Data

Blood samples were obtained early in the morning after a 12 h fasting period by venipuncture. Samples were kept on ice and sent to the laboratory for analysis. Once centrifuged, fractions were separated and frozen at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for future analyses. CRP levels were measured using a high sensitivity C-Reactive Protein ELISA kit (SK00080-02, Aviscera Bioscience, Inc., Santa Clara, CA, USA). The sensitivity of the assay was 0.15 mg/L. The intra-assay and inter-assay precision were between 4%–6% and 8%–12%, respectively.

2.5. Food and Nutritional Data

The relationship between hs-CRP levels and diet was evaluated by analyzing the association between hs-CRP with nutrients, food items, HEI and whole dietary patterns determined by factor analysis. Information on food and nutrient intake was obtained through a food-frequency questionnaire (FFQ) initially developed for use on adults and previously validated in Spain by Martín-Moreno and cols [22]. For the purpose of this study, the questionnaire was adapted to a primary school population by amending and downscaling the list of foods and portions consumed on the basis of a systematic review of child-population food surveys in Spain [23].

The final version of the questionnaire included a total of 77 food codes grouped into 11 categories by nutrient composition. For each food, the standard serving size was defined (e.g., one cup of milk equivalent to 170 cc.; a dish of lentils, equivalent to 60 g dry weight) and the mean frequency of consumption of such servings over the previous year was ascertained. The questionnaire provided the option of answering, in an open-ended way, in terms of the frequency per day, week, month or year. Using Spanish food-composition tables, a food frequency conversion program was designed, which furnished a database with the annual food consumption and daily nutrient intake frequencies for each individual surveyed.

Overall dietary quality was assessed using the HEI [24]. This index consists of 10 items: five items measure food groups (cereals, vegetables, fruit, dairy products and meat); four measure nutrients (total lipid, saturated fat, cholesterol and sodium); and one item analyzes dietary variety. For each HEI item, a score is obtained between 0 and 10 on a proportional basis. The total score, which can range anywhere from 0 to 100, is obtained by adding up the individual scores for the 10 items; the higher the score the better diet quality.

2.6. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS software package, version 21.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). As the sensitivity of the assay was 0.15 mg/L, observations of hs-CRP within the interval of concentrations from 0 to 0.15 mg/L (33% of the children) were set to 0.15 mg/L. Children with hs-CRP levels equal or above 10 mg/L were excluded of the analysis. As a sex-dependent association between diet and hs-CRP has been previously described [15], sex-stratified analyses were performed. Any dietary variables that were not normally distributed were log transformed to normality prior to analyses. We used a *t*-test or Mann-Whitney test to compare nutrient intake by sex. ANOVA or Kruskal-Wallis test and the corresponding Post Hoc test were used to compare the means of nutrient and food intake depending on hs-CRP levels tertile. To identify major dietary patterns experimental factor analysis was conducted. The identified factors were rotated using a Varimax rotation to ensure that standardized, non-correlated dietary patterns were identified. The Kaiser–Meyer–Olkin (KMO) test was used to evaluate data adequacy for factor analysis. Eigen values higher than one and the Screen plot determined whether the factor should be retained. Regression factor scores were used for partial correlation analyses investigating the association between dietary patterns and hs-CRP.

3. Results

The sample group was made up of 571 children (301 girls and 270 boys), with an average age of 6.7 years. Hs-CRP levels were higher in girls than in boys (Table 1). The energy and percentage of energy from saturated fat intake were slightly lower in girls than in boys, and the percentage of complex carbohydrate intake was slightly higher (Table 1).

Table 1. Anthropometrics measures, hs-CRP levels (mean \pm SD) and daily nutrient intake in children by sex.

Variable	Girls (<i>n</i> = 301)	Boys (<i>n</i> = 270)
Age (years)	6.7 \pm 0.7	6.7 \pm 0.6
Weight (kg)	27.4 \pm 5.9	27.5 \pm 5.6
Height (m)	1.26 \pm 0.07	1.27 \pm 0.06
BMI	17.2 \pm 2.7	17.2 \pm 2.6
z-Score BMI	0.01 \pm 0.96	0.05 \pm 0.98
hs-CRP (mg/L)	1.05 \pm 1.74	0.87 \pm 1.55 *
Energy (Kcal)	2090 \pm 497	2186 \pm 518 *
Protein energy (%)	17.2 \pm 2.4	17.3 \pm 2.5
Total fat energy (%)	45.7 \pm 4.5	46.4 \pm 4.6
Saturated-fat energy (%)	16.4 \pm 2.7	17.2 \pm 2.8 **
Monounsaturated-fat energy (%)	18.4 \pm 2.7	18.3 \pm 2.6
Polyunsaturated-fat energy (%)	8.3 \pm 1.8	8.2 \pm 1.9
Total carbohydrate energy (%)	38.4 \pm 5.8	37.8 \pm 6.0
Complex-carbohydrate energy (%)	18.0 \pm 4.5	17.3 \pm 4.1 *
Simple-carbohydrate energy (%)	21.1 \pm 5.6	21.3 \pm 6.1
Fiber (g)	19.6 \pm 7.2	19.9 \pm 7.6

t-test or Mann–Whitney Test when required, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Simple carbohydrates: Sugars in milk, fruit and sugar cane. Complex carbohydrates: Fiber and starches in whole grains, legumes, nuts, seeds and vegetables.

3.1. Nutrient Intake and hs-CRP Levels

We analyzed the nutrient intake by tertile of hs-CRP levels after adjusting for BMI (Table 2). In girls, those in the highest hs-CRP tertile (hs-CRP ≥ 0.62 mg/L) had a higher intake of saturated fatty acid, and lower intakes of fiber and vitamin A and E when compared to those in tertiles 1 (hs-CRP ≤ 0.15 mg/L) and 2 (hs-CRP levels between 0.16–0.61 mg/L). Girls in the highest hs-CRP tertile had a significantly lower intake of fiber (17.9 \pm 6.3 g/day) compared to those in the lowest tertile (20.8 \pm 7.3 g/day). Vitamin E intake in the highest hs-CRP tertile was significantly lower than the intake in tertiles 1 and 2. The HEI score of the highest tertile of hs-CRP levels in girls (62.8 \pm 10.3) was also significantly lower than the HEI score in the lowest tertile (66.1 \pm 8.9) (Table 2).

These differences were not apparent in boys.

3.2. Food Consumption and hs-CRP Levels

In accordance with the decrease in fiber by hs-CRP tertile described above, we observed a decrease in fruit and vegetable intakes by hs-CRP tertiles in girls (Figure 1). Girls in the highest hs-CRP tertile had a significantly lower intake of vegetables compared to those in tertiles 1 or 2 (154.6 g/day in the tertile 3 versus 181.0 g/day in the tertiles 1–2, $p < 0.05$). Girls in the highest hs-CRP tertile had a significantly lower intake of fruit (173.2 g/day) compared to those in tertile 2 (194 g/day) or tertile 1 (210 g/day) ($p < 0.05$). Again, no differences were found in boys.

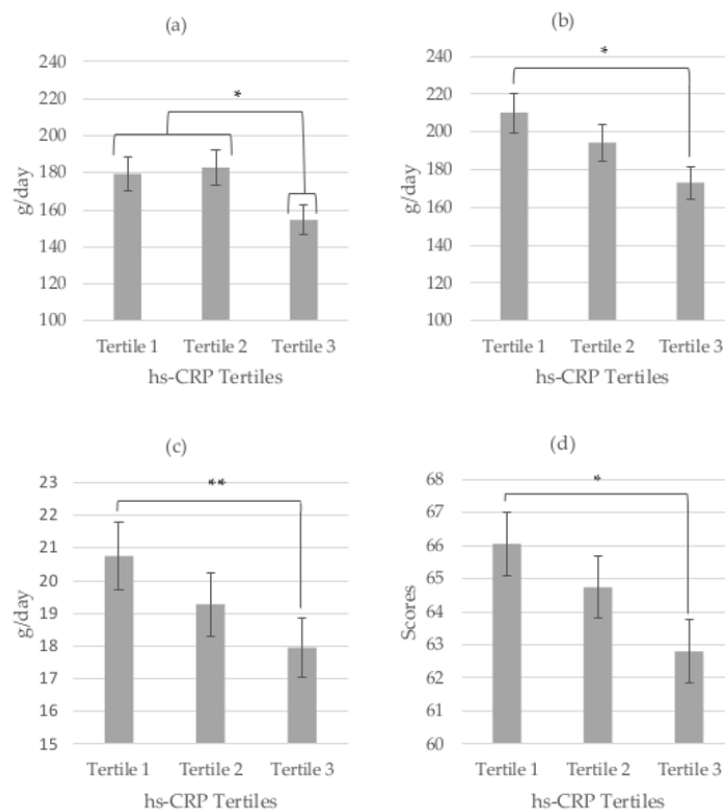
When analyzing specific foods, we observed that marmalade intake was significantly related to hs-CRP levels, with the highest intake associated with the lowest hs-CRP tertile when compared to the higher tertiles (1.6 g/day in the highest tertile versus 3.5 g/day in the lowest; $p < 0.05$).

Table 2. Daily energy, nutrient intakes and HEI score (mean \pm SD) by hs-CRP tertile in pre-pubertal children by sex, adjusted for BMI.

Nutritional Variable	Girls				Boys			
	Tertile 1 (≤ 0.15 mg/L)	Tertile 2 (0.16–0.61 mg/L)	Tertile 3 (≥ 0.62 mg/L)	<i>p</i> Value	Tertile 1 (≤ 0.15 mg/L)	Tertile 2 (0.16–0.61 mg/L)	Tertile 3 (≥ 0.62 mg/L)	<i>p</i> Value
Energy (kcal)	2083 \pm 446	2104 \pm 531	2021 \pm 492	NS	2162 \pm 542	2173 \pm 510	2223 \pm 539	NS
Protein (%)	16.9 \pm 2.5	17.3 \pm 2.7	17.3 \pm 2.5	NS	16.9 \pm 2.7	17.1 \pm 2.3	17.5 \pm 2.4	NS
Total fat (%)	45.3 \pm 4.8	46.3 \pm 4.2	45.7 \pm 4.3	NS	46.0 \pm 4.3	46.7 \pm 4.5	45.6 \pm 4.3	NS
Saturated-fat (%)	15.7 \pm 2.7	16.6 \pm 2.3	17.1 \pm 3.0	1–3 **	17.3 \pm 2.8	17.0 \pm 2.7	16.9 \pm 2.7	NS
Monounsaturated-fat (%)	17.9 \pm 2.5	18.5 \pm 2.8	18.7 \pm 2.9	NS	18.1 \pm 2.4	18.5 \pm 2.5	18.0 \pm 2.4	NS
Polyunsaturated-fat (%)	8.5 \pm 1.9	8.5 \pm 1.8	8.1 \pm 1.8	NS	8.1 \pm 1.8	8.5 \pm 2.1	7.9 \pm 1.8	NS
Total carbohydrate (%)	39.3 \pm 6.1	37.7 \pm 5.3	38.4 \pm 5.8	NS	38.4 \pm 5.9	37.5 \pm 5.6	38.6 \pm 5.7	NS
Simple-carbohydrate (%)	21.6 \pm 5.1	20.8 \pm 5.9	21.3 \pm 6.5	NS	21.9 \pm 6.1	21.1 \pm 5.4	21.7 \pm 5.8	NS
Complex-carbohydrate (%)	18.1 \pm 4.5	17.8 \pm 5.1	17.7 \pm 3.9	NS	17.4 \pm 3.9	17.5 \pm 4.6	17.5 \pm 4.1	NS
Fiber (g)	20.8 \pm 7.3	19.3 \pm 7.7	17.9 \pm 6.3	1–3 **	19.9 \pm 7.4	19.5 \pm 6.2	20.1 \pm 6.5	NS
Vitamin A (μ g)	646 \pm 169	659 \pm 170	616 \pm 206	NS	706 \pm 207	693 \pm 191	700 \pm 212	NS
Vitamin E (mg)	10.8 \pm 3.5	10.9 \pm 4.3	9.8 \pm 4.2	1–3 *	10.8 \pm 4.7	10.9 \pm 3.7	10.6 \pm 3.9	NS
HEI score	66.1 \pm 8.9	64.7 \pm 8.5	62.8 \pm 10.3	1–3 *	63.4 \pm 8.6	64.3 \pm 7.6	65.4 \pm 7.9	NS

%; percentage of total caloric intake supplied by the nutrient; HEI: Healthy Eating Index; NS: not significant; *p* value:

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA adjusting for BMI with the Tukey or Games–Howell post hoc test.

**Figure 1.** (a) Vegetable, (b) fruit and (c) fiber intakes and (d) HEI score by hsCRP tertiles in pre-pubertal girls after adjusting for BMI. (ANOVA and Tukey or Games–Howell Post Hoc test, *p*-value: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3.3. Dietary Patterns and hs-CRP Levels

To identify dietary patterns that could be related to hs-CRP levels, principle component factor analysis was performed. Examination of the subsequent Kaiser–Meyer–Olkin (KMO) measure of sampling adequacy showed that the sample was factorable (KMO = 0.662). By examining the Screen plot and Eigen values, four factors were selected in our population. Two main factors explained most of the variance in food intake. Factor 1 explained 26% of the variance in food intake. It loaded most strongly on fiber, fruit, fruit and vegetable, and vitamin A and E intakes (Table 3). This factor

had a recognizably ‘high vegetable intake’ pattern. The second factor explained another 25% of the variance in food intake. It loaded most strongly on fat intake, particularly monounsaturated and polyunsaturated intakes. We termed this diet the ‘high fat’ diet (Table 3). The high vegetable intake pattern correlated negatively (-0.132 , $p < 0.05$) with hs-CRP in girls after adjusting by BMI. No associations were found between hs-CRP levels and the high fat diet. No correlations for either of the patterns were found in boys.

Table 3. Factor-loading matrix of two dietary patterns (high vegetable intake pattern and high fat intake dietary pattern) identified in our population by factor analysis.

Nutritional Variable	Dietary Patterns as Detected by Factor Analysis	
	Factor 1: High Vegetable Intake Diet	Factor 2: High Fat Intake Diet
Energy	0.786	−0.160
Protein energy (%)	−0.156	0.163
Total fat energy (%)	−0.127	0.921
Saturated fat energy (%)	−0.446	0.217
Monounsaturated fat energy (%)	−0.002	0.782
Polyunsaturated fat energy (%)	−0.005	0.712
Total carbohydrate energy (%)	0.195	−0.853
Complex carbohydrate energy (%)	0.009	−0.384
Simple carbohydrate energy (%)	0.129	−0.538
Fiber	0.814	−0.307
Vitamin A	0.521	0.071
Vitamin E	0.779	−0.002
Fruit	0.711	−0.239
Fruit and vegetables	0.785	−0.267

Coefficients with a significant contribution to the model (values ≥ 0.30) have been underscored.

4. Discussion

We measured hs-CRP levels in a large, population-based sample of pre-pubertal children in Spain, and identified a number of dietary factors associated with hs-CRP levels in girls. Our results show that a high intake of saturated fat and a low intake of fiber and vitamins are related to the highest hs-CRP levels in girls. Furthermore, our findings emphasize that a low HEI score is associated with the highest hs-CRP levels. We also identified a “high vegetable intake dietary pattern” that is associated with lower hs-CRP levels. Our study adds to the literature that has investigated this association in children, finding an association of hs-CRP levels with a characteristic high fiber, high vegetable intake pattern in a well-defined cohort of pre-pubertal girls. The association of fat intake with hs-CRP levels has been extensively studied in adults [7,8,25], and there have been several studies in children [26–28]. Cross-sectional studies have found a positive association between trans-fat or saturated fat intake and CRP levels [7,8], but this has not yet been confirmed in interventional studies. Thus, the results regarding the association between specific types of fat intake and hs-CRP levels in adults remain inconclusive [8]. Similar to our findings, a positive association of saturated fat intake with CRP has been described in six- to 14-year-old Swiss children [26], although the association has not been found in older girls [27].

The association between a higher intake of fruit and vegetables and lower hs-CRP levels appears to be consistent in both adults [10,11] and children [14,15]. However, the association seems to depend on age and sex [15] and weight category status [10]. Sex-related differences in the association of hs-CRP levels with diet characteristics were present in our study, but no differences by weight category were found. Our findings show that a high intake of fruit and vegetables is associated with lower hs-CRP levels in girls only. In some studies in adults, the association has been described only in men but not in women [10]. The IDEFICS Study in European children described differences in the association between hs-CRP and vegetable intake by both age group and sex [15], reporting an association with raw vegetables in boys and older girls and with cooked vegetables in younger girls.

The reason behind the different association depending on sex in our children is unclear. Children in our study showed no significant difference in mean BMI or in the intake of fiber, vitamins or vegetables, and are all pre-pubertal and therefore lacking potential hormonal influences that could affect this association. It is possible that the differences could be attributed to the influence of hormones such as leptin on energy homeostasis. Leptin levels are significantly higher in girls than in boys [29] and have been related to hs-CRP levels in our pre-pubertal population [30].

The high fiber content and high antioxidant levels related to vegetables and fruit may contribute to explaining the association between vegetable and fruit intake and hs-CRP levels. In our population we confirmed a significantly high fiber intake in girls with lower hs-CRP levels. The association of fiber with CRP levels has been reported in some studies [31,32], although a review of the literature has shown that even though the association is evident in epidemiologic studies, intervention studies failed to find any significant association [16]. To our knowledge, how fiber has the potential to modulate hs-CRP levels is unknown. It may be related to its effects on slowing glucose absorption and in modulating the production of inflammatory cytokines by gut microflora [33].

Furthermore, an inverse association of hs-CRP with vitamin A and vitamin E has been reported in our study, supporting the fact that antioxidant nutrients may be responsible for lowering hs-CRP levels. In support of this theory, some studies in adults have reported inverse associations between hs-CRP and other antioxidants, such as vitamin C, vitamin A and β -carotene [10,11,13], although the association has not been found in children [27].

Interestingly, specific foods such as marmalade were significantly associated with hs-CRP levels in our girls. Unfortunately, in our study we lack information regarding the type of marmalade children are consuming. However, similar to our results, a significant inverse association between honey/jam intake and CRP levels was described in the IDEFICS Study in European children [15].

In our study, the overall dietary quality was measured using the HEI [24]. We found an inverse, significant association between hs-CRP with HEI in girls. The HEI score was associated with a higher vegetable intake and a lower fat intake. An inverse association of CRP levels with HEI has also been reported in other studies in adults [34,35] and children [36,37].

Consistent with the results discussed previously, we found that a high vegetable intake pattern had a significant negative association with hs-CRP levels in girls. Our pattern was defined by a high fiber intake, a high intake of fruit and vegetables, and a high intake of vitamins A and E. In studies in adults, similar patterns have been negatively associated with hs-CRP levels [17,32]; however, to our knowledge; the association of dietary patterns with hs-CRP levels has not previously been studied in children.

The main limitation of our study was the method of collecting dietary information. FFQs introduce the potential for recall bias, which is of particular importance in children. We countered this issue by obtaining dietary information from the primary carer of each child, trying to minimize recall bias. Particularly debatable is the definition of the terms “simple and complex carbohydrates”. In addition to fiber, complex carbohydrates in our study included several forms of carbohydrates, including starches. This may contribute to the lack of a significant association between hs-CRP levels and complex carbohydrates, despite our finding of an association between hs-CRP and fiber.

In conclusion, we showed that specific dietary factors—namely saturated fat, fruit and vegetable and fiber intake, and vitamins A and E—were associated with variations in hs-CRP levels in girls, independent of BMI. We identified a high vegetable intake pattern that negatively correlated with hs-CRP. These findings suggest that diet seems to be related to hs-CRP levels already at the pre-pubertal age, emphasizing the need for dietary guidelines in preventing high hs-CRP levels from childhood.

Acknowledgments: This work was supported by a grant from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 14/00344) and the Biobank grant FEDER RD09/0076/00101. Pilar Navarro is a fellow of the Conchita Rábago Foundation. This article is dedicated to the late Manuel de Oya as the warmest homage to his memory. de Oya designed the Four Province Study.

Author Contributions: Pilar Navarro and Olaya de Dios carried out the study data collection and laboratory work, and participated in the analysis and interpretation of data, and in the writing of the manuscript. Asha Jois carried out laboratory work and participated significantly in the writing of the manuscript. Lydia Gorgojo and José M. Martín-Moreno were responsible for the dietary data collection and reviewed the manuscript. Leandro Soriano-Guillén made a substantial contribution to the interpretation of data, and participated in the writing of the manuscript. Carmen Garcés designed and conducted the study, analyzed data and drafted the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kapiotis, S.; Holzer, G.; Schaller, G.; Haumer, M.; Widhalm, H.; Weghuber, D.; Jilma, B.; Röggl, G.; Wolzt, M.; Widhalm, K.; et al. A proinflammatory state is detectable in obese children and is accompanied by functional and morphological vascular changes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2006**, *26*, 2541–2546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Brooks, G.C.; Blaha, M.J.; Blumenthal, R.S. Relation of C-Reactive Protein to Abdominal Adiposity. *Am. J. Cardiol.* **2010**, *106*, 56–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Berenson, G.S.; Wattigney, W.A.; Tracy, R.E.; Newman, W.P.; Srinivasan, S.R.; Webber, L.S.; Dalferes, E.R.; Strong, J.P. Atherosclerosis of the aorta and coronary arteries and cardiovascular risk factors in persons aged 6 to 30 years and studied at necropsy (The Bogalusa Heart Study). *Am. J. Cardiol.* **1992**, *70*, 851–858. [[CrossRef](#)]
4. Tuzcu, E.M.; Kapadia, S.R.; Tutar, E.; Ziada, K.M.; Hobbs, R.E.; McCarthy, P.M.; Young, J.B.; Nissen, S.E. High Prevalence of Coronary Atherosclerosis in Asymptomatic Teenagers and Young Adults. *Circulation* **2001**, *103*, 2705–2710. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Yeh, E.T. H. High-sensitivity C-reactive protein as a risk assessment tool for cardiovascular disease. *Clin. Cardiol.* **2005**, *28*, 408–412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Minihaane, A.M.; Vinoy, S.; Russell, W.R.; Baka, A.; Roche, H.M.; Tuohy, K.M.; Teeling, J.L.; Blaak, E.E.; Fenech, M.; Vauzour, D.; et al. Low-grade inflammation, diet composition and health: Current research evidence and its translation. *Br. J. Nutr.* **2015**, *114*, 999–1012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Giugliano, D.; Ceriello, A.; Esposito, K. The Effects of Diet on Inflammation. Emphasis on the Metabolic Syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2006**, *48*, 677–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Santos, S.; Oliveira, A.; Lopes, C. Systematic review of saturated fatty acids on inflammation and circulating levels of adipokines. *Nutr. Res.* **2013**, *33*, 687–695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Kobayashi, S.; Inoue, N.; Ohashi, Y.; Terashima, M.; Matsui, K.; Mori, T.; Fujita, H.; Awano, K.; Kobayashi, K.; Azumi, H.; et al. Interaction of oxidative stress and inflammatory response in coronary plaque instability: Important role of C-reactive protein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2003**, *23*, 1398–1404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Oliveira, A.; Rodríguez-Artalejo, F.; Lopes, C. The association of fruits, vegetables, antioxidant vitamins and fibre intake with high-sensitivity C-reactive protein: Sex and body mass index interactions. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2009**, *63*, 1345–1352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Navarro, S.L.; Kantor, E.D.; Song, X.; Milne, G.L.; Lampe, J.W.; Kratz, M.; White, E. Factors Associated with Multiple Biomarkers of Systemic Inflammation. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2016**, *25*, 521–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Esmailzadeh, A.; Kimiagar, M.; Mehrabi, Y.; Azadbakht, L.; Hu, F.B.; Willett, W.C. Fruit and vegetable intakes, C-reactive protein, and the metabolic syndrome. *Am. J. Clin. Nutr.* **2006**, *84*, 1489–1497. [[PubMed](#)]
13. Wannamethee, S.G.; Lowe, G.D. O.; Rumley, A.; Bruckdorfer, K.R.; Whincup, P.H. Associations of vitamin C status, fruit and vegetable intakes, and markers of inflammation and hemostasis. *Am. J. Clin. Nutr.* **2006**, *83*, 567–574. [[PubMed](#)]
14. Qureshi, M.M.; Singer, M.R.; Moore, L.L. A cross-sectional study of food group intake and C-reactive protein among children. *Nutr. Metab. (Lond)*. **2009**, *6*, 40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Gonzalez-Gil, E.M.; Santabarbara, J.; Russo, P.; Ahrens, W.; Claessens, M.; Lissner, L.; Brnhorst, C.; Krogh, V.; Iacoviello, L.; Molnar, D.; et al. Food intake and inflammation in European children: The IDEFICS study. *Eur. J. Nutr.* **2016**, *55*, 2459–2468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Buyken, A.E.; Goletzke, J.; Joslowski, G.; Felbick, A.; Cheng, G.; Herder, C.; Brand-Miller, J.C. Association between carbohydrate quality and inflammatory markers: Systematic review of observational and interventional studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **2014**, *99*, 813–833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Barbaresko, J.; Koch, M.; Schulze, M.B.; Nöthlings, U. Dietary pattern analysis and biomarkers of low-grade inflammation: A systematic literature review. *Nutr. Rev.* **2013**, *71*, 511–527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Lee, Y.; Kang, D.; Lee, S.-A. Effect of dietary patterns on serum C-reactive protein level. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2014**, *24*, 1004–1011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Estruch, R. Anti-inflammatory effects of the Mediterranean diet: The experience of the PREDIMED study. *Proc. Nutr. Soc.* **2010**, *69*, 333–340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Bédard, A.; Lamarche, B.; Corneau, L.; Dodin, S.; Lemieux, S. Sex differences in the impact of the Mediterranean diet on systemic inflammation. *Nutr. J.* **2015**, *14*, 46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Royo-Bordonada, M.A.; Gorgojo, L.; Martín-Moreno, J.M.; Garcés, C.; Rodríguez-Artalejo, F.; Benavente, M.; Mangas, A.; de Oya, M. Spanish children's diet: Compliance with nutrient and food intake guidelines. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2003**, *57*, 930–939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Moreiras, O.; Carbajal, Á.; Cabrera, L.; Cuadrado, C. *Tablas de Composición de Alimentos Guía de Prácticas*, 18th ed.; Pirámide: Málaga, Spain, 2016.
23. Gorgojo, L.; Guallar, E.; Martín-Moreno, J.M.; López-Nomdedeu, C.; Vázquez, C.; Martí-Henneberg, C.; Serrano-Ríos, M. Encuestas alimentarias en los niños españoles de edad escolar: Análisis del período 1984–1994. *Med. Clin.* **1999**, *112*, 368–374.
24. Kennedy, E.T.; Ohls, J.; Carlson, S.; Fleming, K. The Healthy Eating Index. Design and Applications. *J. Am. Diet. Assoc.* **1995**, *95*, 1103–1108. [[CrossRef](#)]
25. Steckhan, N.; Hohmann, C.-D.; Kessler, C.; Dobos, G.; Michalsen, A.; Cramer, H. Effects of different dietary approaches on inflammatory markers in patients with metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition* **2016**, *32*, 338–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Aeberli, I.; Molinari, L.; Spinaz, G.; Lehmann, R.; L'Allemand, D.; Zimmermann, M.B. Dietary intakes of fat and antioxidant vitamins are predictors of subclinical inflammation in overweight Swiss children. *Am. J. Clin. Nutr.* **2006**, *84*, 748–755. [[PubMed](#)]
27. Del Mar Bibiloni, M.; Maffei, C.; Llopart, I.; Pons, A.; Tur, J.A. Dietary factors associated with subclinical inflammation among girls. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2013**, *67*, 1264–1270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Negele, L.; Schneider, B.; Ristl, R.; Stulnig, T.M.; Willfort-Ehringer, A.; Helk, O.; Widhalm, K. Effect of a low-fat diet enriched either with rapeseed oil or sunflower oil on plasma lipoproteins in children and adolescents with familial hypercholesterolaemia. Results of a pilot study. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2015**, *69*, 337–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Jois, A.; Navarro, P.; Ortega-Senovilla, H.; Gavela-Pérez, T.; Soriano-Guillén, L.; Garcés, C. Relationship of high leptin levels with an adverse lipid and insulin profile in 6–8 year-old children in Spain. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2015**, *25*, 1111–1116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Navarro, P.; de Dios, O.; Gavela-Pérez, T.; Jois, A.; Garcés, C.; Soriano-Guillén, L. High-Sensitivity C-Reactive Protein and Leptin Levels Related to Body Mass Index Changes Throughout Childhood. *J. Pediatr.* **2016**, 2541–2546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. King, D.E. Effect of a High-Fiber Diet vs. a Fiber-Supplemented Diet on C-Reactive Protein Level. *Arch. Intern. Med.* **2007**, *167*, 502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Estruch, R.; Martínez-González, M.A.; Corella, D.; Basora-Gallisa, J.; Ruiz-Gutierrez, V.; Covas, M.I.; Fiol, M.; Gómez-Gracia, E.; López-Sabater, M.C.; Escoda, R.; et al. Effects of dietary fibre intake on risk factors for cardiovascular disease in subjects at high risk. *J. Epidemiol. Community Health* **2009**, *63*, 582–588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Weickert, M.O.; Pfeiffer, A.F.H. Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 439–442. [[PubMed](#)]
34. Monfort-Pires, M.; Folchetti, L.D.; Previdelli, A.N.; Siqueira-Catania, A.; de Barros, C.R.; Ferreira, S.R. Healthy Eating Index is associated with certain markers of inflammation and insulin resistance but not with lipid profile in individuals at cardiometabolic risk. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2014**, *39*, 497–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Haghighatdoost, F.; Sarrafzadegan, N.; Mohammadifard, N.; Sajjadi, F.; Maghroon, M.; Boshtam, M.; Alikhasi, H.; Azadbakht, L. Healthy Eating Index and Cardiovascular Risk Factors among Iranians. *J. Am. Coll. Nutr.* **2013**, *32*, 111–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lipsky, L.M.; Cheon, K.; Nansel, T.R.; Albert, P.S. Candidate measures of whole plant food intake are related to biomarkers of nutrition and health in the US population (National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002). *Nutr. Res.* **2012**, *32*, 251–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Loprinzi, P.D.; Lee, I.-M.; Andersen, R.E.; Crespo, C.J.; Smit, E. Association of Concurrent Healthy Eating and Regular Physical Activity With Cardiovascular Disease Risk Factors in U.S. Youth. *Am. J. Heal. Promot.* **2015**, *30*, 2–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

19-Feb-2017

Dear Dr. Garces:

I would like to thank you for submitting your manuscript entitled "Relationship between polymorphisms in the CRP, LEP and LEPR genes and high sensitivity C-reactive protein levels in Spanish children." to Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). I have read the revised manuscript and the cover letter. In my opinion you have satisfactorily responded to the comments that were raised by the reviewers.

Therefore, I am pleased to inform you that the manuscript has now been accepted for publication in CCLM.

The CCLM production office will contact you for proof reading as soon as possible.

Your article will be published ahead of print soon, at least 3-4 weeks upon acceptance, and it is scheduled for publication in issue 11 or 12.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine we look forward to your continued contributions to the Journal.

Kind regards

Dr. Deborah A. Payne

Associate Editor, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

Relationship between polymorphisms in the CRP, LEP and LEPR genes and high sensitivity C-reactive protein levels in Spanish children.

Short title: Genetic variants and hs-CRP levels in children

Pilar Navarro¹, Olaya de Dios¹, Teresa Gavela-Pérez ^{1, 2}, Leandro Soriano-Guillen^{1, 2} and Carmen Garcés^{1*}.

¹ Lipid Laboratory, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, Spain.

² Department of Pediatrics, IIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, Spain.

***Corresponding author:**

Dr. Carmen Garcés

Lipid Research Laboratory, IIS-Fundación Jiménez Díaz

Avda. Reyes Católicos, 2. 28040 Madrid, Spain

Telephone: +34-91-5432880, cgarces@fjd.es

2096 words; 2 tables, 1 figure

Abstract

Background: We investigated the association of SNPs in the C-reactive protein (CRP), leptin (LEP) and leptin receptor (LEPR) genes with high sensitivity CRP (hs-CRP) levels in two independent cohorts of healthy Spanish children.

Methods: We measured hs-CRP levels in 646 6-8-year-olds and 707 12-16-year-old children using a high-sensitivity C-Reactive Protein ELISA kit. Four SNPs in the CRP gene (rs1205, rs1130864, rs2794521 and rs1800947), one SNP in the LEP gene (rs7799039) and two SNPs in the LEPR (rs1137100 and rs1137101) gene were determined by TaqMan® allelic discrimination assays.

Results: The four CRP SNPs studied were significantly ($p < 0.05$) associated with hs-CRP levels in both cohorts. Furthermore, two common CRP haplotypes (constructed using the SNPs in order: rs1205, rs1130864, rs1800947, rs2794521) ACGA and GCGG were associated with significantly lower CRP levels ($p < 0.05$) at both ages. The LEPR SNPs rs1137100 (K109R) and rs1137101 (Q223R), and LEP SNP rs7799039 (G2548A) were also associated to hs-CRP levels ($p < 0.05$) in both cohorts.

Conclusion: hs-CRP levels in healthy Spanish children, besides being associated to common polymorphisms in the CRP gene, are associated to polymorphisms in the leptin and leptin receptor genes, which suggests that other loci, in addition the CRP gene, may have a role determining CRP levels in children.

Keywords: hs-CRP levels, CRP polymorphisms, LEP polymorphisms, children.

Abbreviations: BMI: body mass index ; CRP: C-reactive protein; hs-CRP: high sensitivity CRP; IL-6: interleukin 6; LEP: leptin, LEPR: leptin receptor; SNP: single nucleotide polymorphism; TNF: tumor necrosis factor.

Introduction

Obesity is associated with the secretion of inflammatory markers such as C-reactive protein (CRP) [1, 2]. Adipocytokines derived from adipose tissue, such as interleukin 6 (IL-6), stimulate hepatic inflammation, inducing the production of CRP, acting as a marker of nonspecific systemic inflammation [1].

Variants in the CRP gene have been associated with CRP levels [3-6], showing higher or lower CRP levels depending on the different SNPs studied. SNPs such as rs1205, located in the 3'UTR region, and rs1800947, in the exonic region, have been associated with lower CRP levels [5, 7-10]. The SNP rs1130864, in the 3'UTR region, and the SNP rs2794521, in the promoter region of the CRP gene, have shown different associations with CRP levels depending on the studied population and gender [7, 8, 10, 11]. However, candidate-gene studies focused on the CRP gene itself have explained only a fraction of the estimated variance due to genetic variants [3, 4, 12].

It has been described that the CRP gene is up-regulated by inflammatory cytokines [5]. It is known that the CRP promoter region contains interleukin-6 responsive elements that regulate CRP gene expression [13]. In addition, functional polymorphisms on the IL-6 and TNF-alpha genes have been related with CRP levels [5, 14]. A structural identity has been described between IL-6 and leptin [15]. Besides, a correlation between leptin and CRP levels has been reported in some studies [16-19]. Therefore, we hypothesize that genetic variants in the leptin and leptin receptor genes could contribute to explain the interindividual variability in plasma CRP levels.

Thus, the aim of our study was to evaluate the association of high sensitivity CRP (hs-CRP) levels with the SNPs rs1205, rs1130864, rs1800947 and rs2794521 in the CRP gene, the SNPs rs1137100, rs1137101 and rs8179183 in the LEPR gene and the SNP rs7799039 in the LEP gene in healthy Spanish children.

Subjects and Methods

Subjects: Our population-based samples comprise 646 6-8-year-old children and 707 12-16-year-old children. Subjects were participants in two cross-sectional studies examining cardiovascular risk factors in Spanish schoolchildren.

Ethical approval: The study protocol complied with Helsinki Declaration guidelines and was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the IIS-Fundación Jiménez Díaz. Parents were required to provide written consent in order for their children to participate in the study.

All children reported by their parents to be suffering from chronic diseases were excluded. A team consisting of one physician and several nurses was in charge of blood extractions. Fasting (12 hours) venous blood samples were collected.

hs-CRP and leptin measurement: Plasma hs-CRP levels were measured using a high sensitivity C-Reactive Protein ELISA kit (CRP High Sensitivity SK00080-02, Aviscera Bioscience, Inc., Santa Clara, USA). The sensitivity of the assay was 0.15 mg/l. Children with hs-CRP levels equal or above 10 mg/l were excluded from the study to avoid the influence of acute infection. Plasma leptin levels were determined by ELISA using a commercially available kit (Leptin EIA-2395, DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany).

Genetic determination: Genomic DNA was prepared from leukocytes. Four SNPs in the CRP gene (3' UTR G/A [rs1205], 3' UTR C/T [rs1130864], promoter A/G [rs2794521], exon 2 G/C [rs1800947]) were genotyped using custom allelic discrimination TaqMan® assays (C_7479334_10, C_7479332_10, C_318207_10 and C_177490_10 respectively, Applied Biosystems). A 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) was employed to make allelic discrimination calls. PCR was performed with a mixture of 20 ng of DNA, 900 nM of primers, 200 nM of probes and 2 X Taqman Genotyping master mixes (Applied Biosystems). Samples were cycled under the recommended conditions: 95C for 10 min, 92C for 15 sec and 60C for 1 min, repeated over 40 cycles. Polymorphisms in the exonic region of leptin receptor (LEPR) gene (K109R [rs1137100], Q223R [rs1137101]) and in the promoter region of the leptin (LEP) gene G2548A [rs7799039] had been previously analyzed in our cohort (20, 21).

Statistical analysis: Statistical analyses were carried out using the SPSS software package,

version 21.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Allele frequencies were calculated by allele counting. Genotypic and allelic frequencies were compared using the χ^2 test. Kruskal-Wallis test and U Mann-Whitney test were used to compare hs-CRP and leptin levels among genotypes. Haplotypes were estimated using the program R 3.3.0. Haplo.stats. Specifically, haplo.stats library haplo.glm function has been used. Each analysis shows the haplotypes, the coefficients for each haplotype, the confidence intervals 95% of the coefficients, and their p-values.

Results

Prevalence of the less common allele for the rs1205 CRP polymorphism (A) was 33% (45% GA and 10% AA), for the SNP rs1130864 (T) was 35% (47% CT, 11% TT) and for the SNP rs2794521 (G) prevalence was and 24% (36% AG, 6% GG). Prevalence of the rare allele for the rs1800947 polymorphism (C) was 6% (11% GC and 0.3% CC). The genotype frequencies for all the SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium.

Figure 1 shows hs-CRP levels (mg/l) by CRP genotypes for the SNPs rs1205, rs1130864, rs2794521 and rs1800947 in 6-8 year-old and 12-16 year-old children. The x axis shows the genotypes for each SNP in the order of homozygous major alleles, heterozygotes and homozygous minor alleles. We have found a significant association between hs-CRP levels and the four studied CRP SNPs at both ages (figure 1).

We identified two frequent CRP haplotypes (constructed using the SNPs in order: rs1205, rs1130864, rs1800947, rs2794521) ACGA and GCGG that were associated with significantly lower CRP levels ($p < 0.05$) at both ages. Furthermore, the ACCA haplotype in 6-8 year-old children and the ATGA haplotype in 12-16 year-old children were also associated with lower CRP levels. These haplotypes were consistently associated with lower hs-CRP levels, after adjusting by sex, age and BMI (table 1).

When analyzing the association of LEP and LEPR polymorphisms with hs-CRP levels, we observed that the LEP rs7799039 (G2548A) polymorphism was significantly associated ($p < 0.05$) with hs-CRP levels in both groups of age, with the A allele being associated with lower hs-CRP levels. We also found that 12-16 year-old carriers of GG genotype for the rs1137101 (Q223R) showed significantly ($p = 0.013$) higher hs-CRP levels than wild type AA carriers (table 2), and 6-8 year-old carriers of GG genotype showed significantly higher hs-CRP levels than AA and GG carriers. Carriers of GG genotype for the LEPR SNP rs1137100 (K109R) showed significantly ($p < 0.01$) higher hs-CRP levels than AA and AG carriers at both ages (table 2).

Discussion

Most of the variance on CRP levels presumably related to genetic factors remains unexplained. In our study, besides confirming the association of common polymorphisms in the CRP gene with CRP levels in children, we demonstrate the association of the SNP rs7799039 in the LEP gene and the SNPs rs1137100 and rs1137101 in the in the LEPR gene with CRP levels. Our findings have been confirmed in two independent cohorts of children.

Two SNPs in the 3'UTR region of the CRP gene (rs1205 and rs1130864), one SNP at the promoter region (rs2794521) and one exonic SNP (rs1800947) have been analyzed in our study. The prevalence of these SNPs in our population is similar to that described in other populations [6, 8].

Regarding the SNPs in the 3'UTR region, we have observed that the minor allele A of the rs1205 polymorphism is associated with lower hs-CRP levels, and the minor allele T of rs1130864 SNP with higher hs-CRP levels at both ages. These results are consistent with previous studies in adults [7-11, 22]. It has been described that the T allele of the rs1130864 SNP is associated with increased mRNA stability, and the G allele of SNP rs1205 with an increased expression of CRP [23]. Studies in children however are scarce. We have only found a study that, similar to our results, reported an association of the rs1130864 SNP with hs-CRP levels in Mexican adolescents [14].

Similar to our results, several studies in adults have reported an association of the minor allele C of rs1800947 SNP with low hs-CRP levels [7-9, 11]. It should be noted that we didn't find any study analyzing the influence of this SNP on hs-CRP in children.

We have also found a significant association of the rs2794521 SNP in the promoter region of the CRP gene with hs-CRP levels, with carries of the major allele A showing significantly higher hs-CRP levels than non-carriers. Similar findings have been reported in other studies [11, 24], and an increase in the transcriptional activity of the promoter of CRP gene associated to the major allele A of this SNP has been described [25].

We have also confirmed in our study the association of hs-CRP levels with CRP haplotypes. Three frequent haplotypes derived from the four studied polymorphism have been associated with lower hs-CRP in our children. A previous study has described the association of CRP haplotypes and

CRP levels in childhood and reported the association between CRP haplotypes and lifelong differences in mean CRP levels [26].

An interesting result of our study is the association of LEP and LEPR polymorphisms and CRP levels. Our findings show an association of the less common LEP SNP rs7799039 with lower hs-CRP levels, and an association of the the LEPR SNPs rs1137101 and rs1137100 polymorphisms with higher hs-CRP levels. Previous studies in our population has shown a significant association between leptin levels and the LEP rs7799039 (G2548A) [20] and LEPR rs1137101 (Q223R) [21], but failed to find any association between leptin levels and the LEPR rs1137100 (K109R) [21], suggesting that the association of these polymorphisms with CRP levels may go beyond its association with leptin levels. LEPR genetic variants have also been associated with hs-CRP levels in adults [27-30] and young adults [31].

In conclusion, our study confirms the association of common genetic variants in the CRP gene with hs-CRP levels in Spanish children, and shows that polymorphism of the leptin and leptin receptor genes seem also contribute to explain the interindividual variability of CRP levels. Further studies are needed to investigate these associations in other populations.

Acknowledgements: This article is dedicated to the late Prof. Manuel de Oya as the warmest homage to his memory. Prof. de Oya designed the Four Province Study.

Conflict of interest: None declared.

Author contributions: All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission.

Research funding: This work was supported by a grant from the Fondo de Investigación Sanitaria /FEDER (FIS14/00344) and Biobank grant FEDER RD09/0076/00101.

Employment or leadership: Pilar Navarro and Olaya de Dios are fellows of the Conchita Rábago Foundation.

Honorarium: None declared.

Competing interests: The funding organization played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

References

1. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:972-8.
2. Choi J, Joseph L, Pilote L. Obesity and C-reactive protein in various populations: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 2013;14:232-4.
3. Carlson CS, Alfred SF, Lee PK, Tracy RP, Schwartz SM, Rieder M, et al. Polymorphisms within the C-reactive protein (CRP) promoter region are associated with plasma CRP plasma. *Am J Hum Genet* 2005;77:64-77.
4. Kathiresan S, Larson MG, Vagan RS, Guo CY, Gona P, Keaney JF Jr, et al. Contribution of clinical correlates and 13 C-reactive protein gene polymorphisms to interindividual variability in serum C-reactive protein level. *Circulation* 2006;113:1415-23.
5. Danik JS, Ridker PM. Genetic determinants of C-reactive protein. *Curr Atheroscler Rep* 2007;9:195-203.
6. Hage FG, Szalai AJ. The role of C-reactive protein polymorphisms in inflammation and cardiovascular risk. *Curr Atheroscler Rep* 2009;11:124-30.
7. Martínez-Calatrava MJ, González-Sánchez JL, Martínez-Larrad MT, Pérez-Barba M, Serrano-Ríos M. Common haplotypes of the C-reactive protein gene and circulating leptin levels influence the interindividual variability in serum C-reactive protein levels. The Segovia study. *Thromb Haemost* 2007;98:1088-95.
8. Komurcu-Bayrak E, Erginel-Unaltuna N, Onat A, Ozsait B, Eklund C, Hurme M, et al. Association of C-reactive protein (CRP) gene allelic variants with serum CRP levels and hypertension in Turkish adults. *Atherosclerosis* 2009;206:474-9.
9. Kong H, Qian YS, Tang XF, Zhang J, Gao PJ, Zhang Y, Zhu DL. C-reactive protein (CRP) gene polymorphism, CRP levels and risk of incident essential hypertension: findings from an observational cohort of Han Chinese. *Hypertens Res* 2012;35:1019-23.
10. Martínez-Calleja A, Quiróz-Vargas I, Parra-Rojas I, Muñoz-Valle JF, Leyva-Vázquez MA, Fernández-Tilapa G, et al. Haplotypes in the CRP gene associated with increased BMI and levels

of CRP in subjects with type 2 diabetes or obesity from Southwestern Mexico. *Exp Diabetes Res* 2012;2012:982683.

11. Lee CC, You NC, Song Y, Hsu YH, Manson J, Nathan L, et al. Relation of genetic variation in the gene coding for C-reactive protein with its plasma protein concentrations: findings from the Women's Health Initiative Observational Cohort. *Clin Chem* 2009;55:351-60.

12. Crawford DC, Sanders CL, Qin X, Smith JD, Shephard C, Wong M, et al. Genetic variation is associated with C-reactive protein levels in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation* 2006;114:2458-65.

13. Li SP, Liu TY, Goldman ND. cis-acting elements responsible for interleukin-6 inducible C-reactive protein gene expression. *J Biol Chem* 1990;265:4136-42.

14. Mendoza-Carrera F, Ramírez-López G, Ayala-Martínez NA, García-Zapién AG, Flores-Martínez SE, Sánchez-Corona J. influence of CRP, IL-6, and TNFA gene polymorphisms on circulating levels of C-reactive protein in mexican adolescents. *Arch Med Res* 2010;41:472-7.

15. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 2000;68:437-46.

16. Nakamura Y, Ueshima H, Okuda N, Miura K, Kita Y, Okamura T, et al. Relation of Serum Leptin and Adiponectin Level to Serum C-Reactive Protein: The INTERLIPID Study. *Int J Vasc Med* 2013;2013:601364.

17. Stakos DA, Papaioannou HI, Angelidou I, Mantadakis E, Paraskakis E, Tsigalou C, Chatzimichael A. Plasma leptin and adiponectin concentrations correlate with cardiometabolic risk and systemic inflammation in healthy, non-obese children. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2014;27:221-8.

18. Hribal ML, Fiorentino TV, Sesti G. Role of C reactive protein (CRP) in leptin resistance. *Curr Pharm Des* 2014;20:609-15.

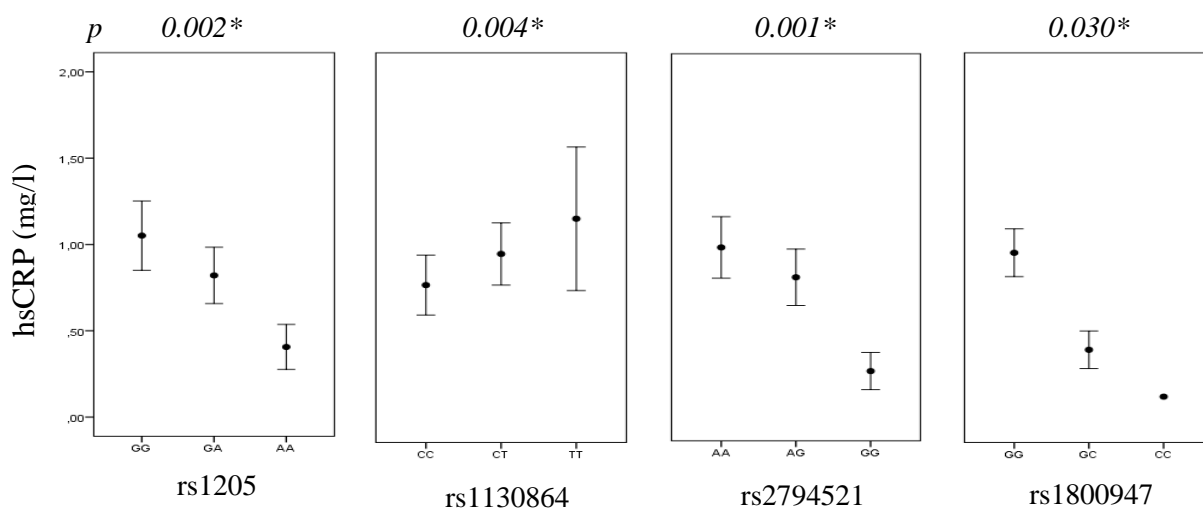
19. Navarro P, de Dios O, Gavela-Perez T, Jois A, Garces C, Soriano-Guillén L. High-sensitivity C-reactive protein and leptin levels related to Body Mass Index changes throughout childhood. *J Pediatr* 2016;178:178-82.

20. Riestra P, García-Anguita A, Schoppen S, López-Simón L, De Oya M, Garcés C. Sex-specific association between leptin receptor polymorphisms and leptin levels and BMI in healthy adolescents. *Acta Paediatr* 2010;99:1527-30.
21. Riestra P, García-Anguita A, Viturro E, Schoppen S, De Oya M, Garcés C. Influence of the leptin G-2548A polymorphism on leptin levels and anthropometric measurements in healthy Spanish adolescents. *Ann Hum Genet* 2010;74:335-9.
22. Schumacher W, Cockcroft J, Timpson NJ, McEniery CM, Gallacher J, Rumley A, et al. Association between C-reactive protein genotype, circulating levels, and aortic pulse wave velocity. *Hypertension* 2009;53:150-57.
23. Russell AI, Cunninghame-Graham DS, Shepherd C, Robertson CA, Whittaker J, Meeks J, et al. Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 2004;13:137-47.
24. Kotłęga D, Białecka M, Kurzawski M, Drożdżik M, Ciećwież S, Gołąb-Janowska M, Nowacki P. Risk factors of stroke and -717A>G (rs2794521) CRP gene polymorphism among stroke patients in West Pomerania province of Poland. *Neurol Neurochir Pol* 2014;48:30-4.
25. Wang L, Lu X, Li Y, Li H, Chen S, Gu D. Functional analysis of the C-reactive protein (CRP) gene -717 A>G polymorphism associated with coronary heart disease. *BMC Med Genet* 2009;10:73.
26. Kivimäki M, Lawlor DA, Smith GD, Eklund C, Hurme M, Lehtimäki T, et al. Variants in the CRP gene as a measure of lifelong differences in average C-reactive protein levels: the Cardiovascular Risk in Young Finns study, 1980-2001. *Am J Epidemiol* 2007;166:760-4.
27. Ridker PM, Pare G, Parker A, Zee RY, Danik JS, Buring JE, et al. Loci related to metabolic-syndrome pathways including LEPR, HNF1A, IL6R, and GCKR associate with plasma C-reactive protein: the Women's Genome Health Study. *Am J Hum Genet* 2008;82:1185-92.
28. Reiner AP, Beleza S, Franceschini N, Auer PL, Robinson JG, Kooperberg C, et al. Genome-wide association and population genetic analysis of C-reactive protein in African American and Hispanic American women. *Am J Hum Genet* 2012;91:502-12.

29. Zang YY, Gottardo L, Mlynarski W, Frazier W, Nolan D, Duffy J, et al. Genetic variability at the leptin receptor (LEPR) locus is a determinant of plasma fibrinogen and C-reactive protein levels. *Atherosclerosis* 2007;191:121-7.
30. Elliott P, Chambers JC, Zhang W, Clarke R, Hopewell JC, Peden JF, et al. Genetic loci associated with C-reactive protein levels and risk of coronary heart disease. *JAMA* 2009;302:37-48.
31. Curocichin G, Wu Y, McDade TW, Kuzawa CW, Borja JB, Qin L, et al. Single-nucleotide polymorphisms at five loci are associated with C-reactive protein levels in a cohort of Filipino young adults. *J Hum Genet* 2011;56:823-7.

Figure 1. Association between CRP genetic variants and hs-CRP plasma (mg/l) in 6-8-year-olds and 12-16-year-old children. (The error bar shows the 95% CI of the geometric mean. * $p < 0.05$)

6-8 year-old children



12-16 year-old children

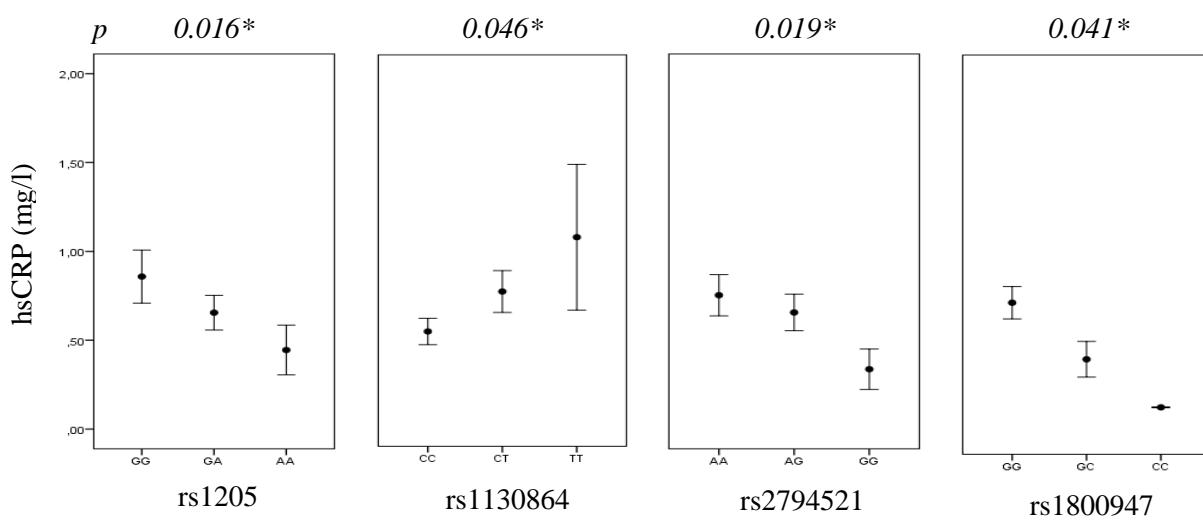


Table 1. Association of CRP haplotypes with CRP levels in 6-8 year-olds and 12-16 year-old children

		Unadjusted analysis		Adjusted analysis ^c	
Haplotype ^a		Coef. (95% CI) ^b	p	Coef. (95% CI) ^b	p
6-8 year-olds					
CRP	GTGA	Reference			
(n=490)	ACCA	-0.43 (-0.74, -0.11)	0.009	-0.42 (-0.74, -0.11)	0.009
	ACGA	-0.25 (-0.45, -0.05)	0.014	-0.24 (-0.44, -0.05)	0.016
	GCGA	-0.04 (-0.30, 0.21)	0.753	-0.06 (-0.32, 0.20)	0.660
	GCGG	-0.33 (-0.52, -0.14)	0.001	-0.33 (-0.52, -0.14)	0.001
12-16 year-olds					
CRP	GTGA	Reference			
(n=685)	ACCA	-0.10 (-0.35, 0.15)	0.443	-0.09 (-0.35, 0.16)	0.471
	ACGA	-0.19 (-0.33, -0.04)	0.013	-0.18 (-0.33, -0.03)	0.016
	ATGA	-0.64 (-1.16, -0.12)	0.016	-0.65 (-1.17, -0.13)	0.014
	GCGA	0.01 (-0.19, 0.20)	0.927	0.01 (-0.18, 0.21)	0.900
	GCGG	-0.18 (-0.33, -0.03)	0.016	-0.18 (-0.33, -0.03)	0.016

^a Haplotypes in order of rs1205, rs1130864, rs1800947 and rs2794521

^b Coefficient (95% CI) and p were calculated by haplo.glm function implemented in Haplo.stats program. Coefficient represents difference between CRP levels in geometric means comparing to reference haplotype

^c Adjusted analysis by sex, age and BMI

Table 2. hs-CRP levels (mean±standard deviation) by LEP and LEPR genotypes

LEP rs7799039 (G2548A) genotypes			
<u>6-8 year-old children</u>		<u>12-16 year-old children</u>	
GG (195)	1.10±1.91	GG (235)	0.81±1.23
GA (321)	0.89±1.47	GA (346)	0.69±1.04
AA (124)	0.55±0.78	AA (126)	0.51±0.54
GG-AA*		GG-AA*	

LEPR rs1137101 (Q223R) genotypes			
<u>6-8 year-old children</u>		<u>12-16 year-old children</u>	
AA (221)	0.68±0.94	AA (184)	0.35±0.29
AG (319)	0.89±1.58	AG (302)	0.44±0.47
GG (103)	1.54±2.43	GG (134)	0.75±1.22
AA-GG*, AG-GG*		AA-GG**	

LEPR rs1137100 (K109R) genotypes			
<u>6-8 year-old children</u>		<u>12-16 year-old children</u>	
AA (364)	0.72±0.99	AA (388)	0.70±0.99
AG (241)	0.96±1.76	AG (287)	0.65±0.95
GG (41)	2.57±3.23	GG (29)	1.27±1.80
AA-GG*, AG-GG*		AA-GG**, AG-GG**	

U Mann –Whitney test *p<0.05 **<0.01

